Fisiologia Vegetal

Lincoln Taiz
University of California, Santa Cruz
Eduardo Zeiger
University of California, Los Angeles

3ª Edição

1ª reimpressão

artmed®

2006

Sumário detalhado

1 Células vegetais 29

2 [Na Internet] Energia e enzimas 57

PARTE I
Transporte e translocação de água e solutos 59

3 A água e as células vegetais 61

4 Balanço hídrico das plantas 75

5 *Nutrição mineral* 95

6 *Transporte de solutos* 115

PARTE II
Bioquímica e metabolismo 137

7 Fotossíntese: as reações luminosas 139

8 Fotossíntese: reações de carboxilação 173

9 Fotossíntese: considerações fisiológicas e ecológicas 199

10 Translocação no floema 221

11 Respiração e metabolismo de lipídeos 251

13 Metabólitos secundários e defesa vegetal 309

PARTE III
Crescimento e desenvolvimento 335

17 *O fitocromo e o controle do desenvolvimento das plantas pela luz* 401

18 Respostas à luz azul: movimentos estomáticos e morfogênese 429

19 Auxina: o hormônio de crescimento 449

20 Giberelinas: reguladores da altura dos vegetais 485

21 Citocininas: reguladores da divisão celular 517

22 *Etileno: o hormônio gasoso* 541

23 *Ácido abscísico: um sinal para a maturação de semente e antiestresse* 561

25 *Fisiologia do estresse* 613

Capítulo

1

Células vegetais

O TERMO *CÉLULA* DERIVA-SE do latim *cella*, cujo significado é despensa ou câmara. Inicialmente, foi empregado na biologia em 1665, pelo botânico inglês Robert Hooke, para descrever as unidades individuais de uma estrutura do tipo favos de mel, que ele observou em cortiça, sob um microscópio primitivo. As "células" que Hooke observou eram, na verdade, lumes vazios de células mortas, delimitados por paredes celulares; mas a expressão é apropriada, pois as células são as unidades básicas que definem a estrutura vegetal.

Este livro dará ênfase às funções fisiológicas e bioquímicas dos vegetais, embora seja importante reconhecer que tais funções dependem das estruturas, quer seja o processo uma troca gasosa na folha, a condução de água no xilema, a fotossíntese no cloroplasto ou o transporte de íons através da membrana. Em qualquer nível, a estrutura e a função representam diferentes planos de referência de uma unidade biológica.

Este capítulo proporciona uma visão geral da anatomia básica dos vegetais, do nível de órgãos até a ultra-estrutura das organelas. Nos capítulos subseqüentes, as estruturas serão tratadas em maior detalhe sob a perspectiva das suas funções fisiológicas no ciclo de vida dos vegetais.

A VIDA VEGETAL: PRINCÍPIOS UNIFICADORES

A grande diversidade de tamanhos e de formas vegetais é familiar a todos nós. Os vegetais variam, em tamanho, de menos de 1 cm até mais do que 100 m de altura. A morfologia, ou a forma, é também surpreendentemente diversa. À primeira vista, a pequena planta lentilha d'água (*Lemma*) parece ter muito pouco em comum com o cacto gigante ou a sequóia. Mesmo assim, independente das suas adaptações específicas, todos os vegetais executam processos similares e estão baseados no mesmo plano arquitetural. É possível resumir os principais elementos que caracterizam vegetais como segue:

- Os produtores primários da Terra, as algas verdes, são os coletores básicos da energia solar. Elas captam a energia da luz solar, convertendo a energia luminosa em energia química, a qual é armazenada nas ligações formadas durante a síntese de carboidratos, a partir do dióxido de carbono e da água.

- Com exceção de certas células reprodutivas, os vegetais não são móveis. Em substituição à mobilidade, eles desenvolveram a capacidade de crescer em busca dos recursos essenciais, tais como luz, água e nutrientes minerais, durante todo o seu ciclo de vida.
- As plantas terrestres são estruturalmente reforçadas para dar suporte à sua massa, à medida que elas crescem em direção à luz e contra a força da gravidade.
- As plantas terrestres perdem água continuamente por evaporação e desenvolveram mecanismos para evitar a dessecação.
- As plantas terrestres apresentam mecanismos para transportar água e sais minerais do solo para os locais de fotossíntese e de crescimento, bem como para transportar os produtos da fotossíntese para os tecidos e órgãos não-fotossintetizantes.

UMA VISÃO GERAL DA ESTRUTURA VEGETAL

Apesar da sua aparente diversidade, o corpo de todas as espermatófitas (ver **Tópico 1.1 na Internet**) apresenta o mesmo plano básico (Figura 1.1). O corpo vegetativo é composto de três órgãos: a **folha**, o **caule** e a **raiz**. A função primordial da folha é a fotossíntese, a do caule, a sustentação e a da raiz, a fixação e a absorção de água e de minerais. As folhas estão ligadas ao caule pelos **nós**, denominando-se **entrenó** a região do caule localizada entre os nós. O caule, juntamente com suas folhas, é normalmente referido como **parte aérea**.

Existem duas categorias de espermatófitas: as gimnospermas (do grego, sementes nuas) e as angiospermas (também do grego, "sementes em recipiente", ou sementes contidas em uma urna). As **gimnospermas** constituem o tipo menos evoluído, com cerca de 700 espécies conhecidas. O maior grupo das gimnospermas é representado pelas coníferas ("portadoras de cones"), as quais incluem árvores de importância comercial, como o pinheiro, o abeto e a sequóia.

As **angiospermas**, o tipo mais evoluído de plantas com sementes, tornaram-se abundantes durante o período Cretáceo, há cerca de 100 milhões de anos. Hoje, elas dominam as paisagens e competem naturalmente com as gimnospermas. Cerca de 250 mil espécies são conhecidas, mas muitas permanecem sem caracterização. A principal inovação das angiospermas é a flor, razão pela qual são referidas como *plantas com flores* (ver **Tópico 1.2 na Internet**).

As células vegetais são delimitadas por paredes celulares rígidas

Uma diferença fundamental entre os vegetais e os animais é a presença de uma **parede celular** rígida delimitando as células vegetais. Em animais, as células embrionárias podem migrar de um lugar para outro, resultando no desenvolvimento de órgãos e tecidos contendo células que se originaram em diferentes partes do organismo.

Nos vegetais, as migrações celulares são impedidas, pois a **lamela média** liga firmemente as células adjacentes. Como conseqüência, o desenvolvimento vegetal, ao contrário do animal, depende exclusivamente dos padrões de divisão e de expansão celulares.

FIGURA 1.1 Representação esquemática do corpo de uma dicotiledônea típica. Secções transversais de (A) folha, (B) caule e (C) raiz são também apresentadas. Os detalhes mostram seções longitudinais do ápice da parte aérea e do ápice da raiz de linho (*Linum usitatissimum*), indicando os meristemas apicais. (Fotografias ©J. Robert Waaland/ Biological Photo Service.) ▶

As células vegetais apresentam dois tipos de parede: primária e secundária (Figura 1.2). As **paredes celulares primárias** são tipicamente finas (menos de 1 μm), caracterizando células jovens e em crescimento. As **paredes celulares secundárias**, mais espessas e resistentes que as primárias, são depositadas quando a maior parte do crescimento está concluído. As paredes secundárias devem sua resistência e rigidez à **lignina** (ver Capítulo 13).

A evolução das paredes celulares lignificadas proporcionou aos vegetais o reforço estrutural necessário para crescerem verticalmente acima do solo e conquistarem o ambiente terrestre. As briófitas, que não apresentam paredes celulares lignificadas, são incapazes de crescer mais do que poucos centímetros acima da superfície do solo.

As novas células são produzidas por tecidos em divisão denominados meristemas

O crescimento vegetal está concentrado em regiões específicas de divisão celular chamadas de **meristemas**. Quase todas as divisões nucleares (mitose) e as divisões celulares (citocinese) ocorrem nestas regiões meristemáticas. Na planta jovem, os meristemas mais ativos são conhecidos como **meristemas apicais**; eles estão localizados nos ápices do caule e da raiz (Figura 1.1). Nos nós, as **gemas axilares** contêm meristemas apicais para os ramos laterais. As raízes laterais surgem do **periciclo**, um tecido meristemático interno (Figura 1.1C). Próximo (i. é, ao lado) e sobrepondo as re-giões meristemáticas situam-se as zonas de alongamento, nas quais as células aumentam intensamente em comprimento e largura. Em geral, as células diferenciam-se em tipos especializados após terem se alongado.

A fase do desenvolvimento vegetal que dá origem aos novos órgãos e a forma básica da planta é denominada **crescimento primário**. O crescimento primário resulta da atividade dos meristemas apicais, nos quais a divisão celular é seguida pela progressiva expansão celular, normalmente por alongamento. Uma vez concluído o alongamento em uma determinada região, pode ocorrer o **crescimento secundário**, o qual envolve dois meristemas laterais: o **câmbio vascular** e o **felogênio**. O câmbio vascular origina o xilema secundário (madeira) e o floema secundário. O felogênio produz a periderme, constituída principalmente de células do súber (felema).

O corpo da planta é formado por três sistemas de tecidos principais

Três principais sistemas de tecidos são encontrados em todos os órgãos da planta: tecido dérmico, tecido fundamental e tecido vascular, os quais estão ilustrados e brevemente caracterizados na Figura 1.3. Para detalhes adicionais e caracterização dos mesmos, ver **Tópico 1.3 na Internet**.

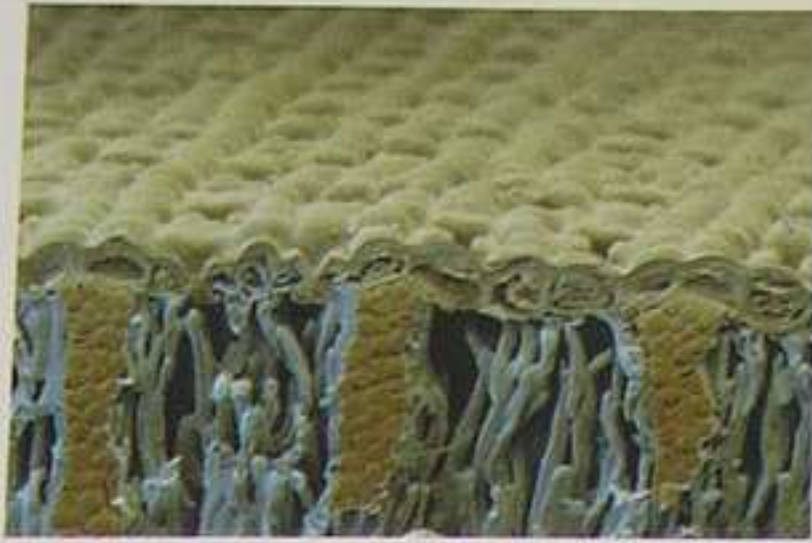
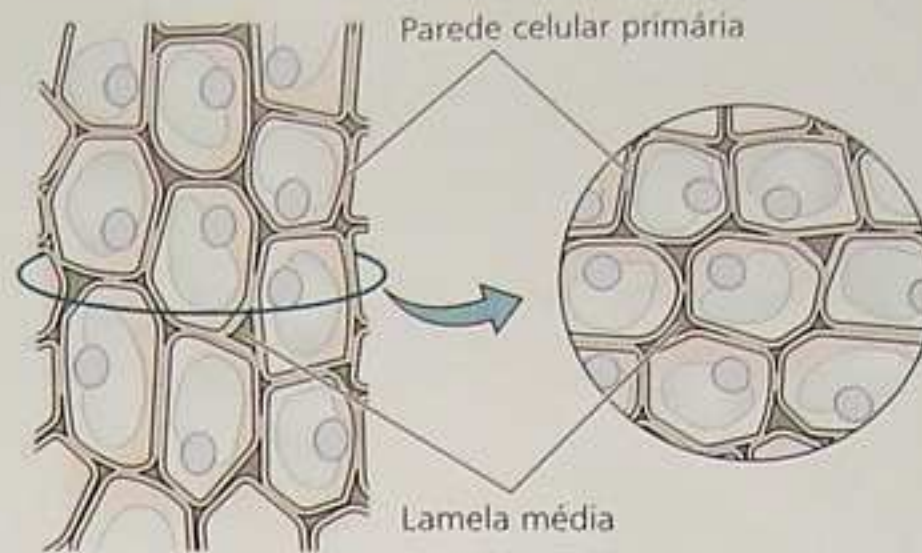
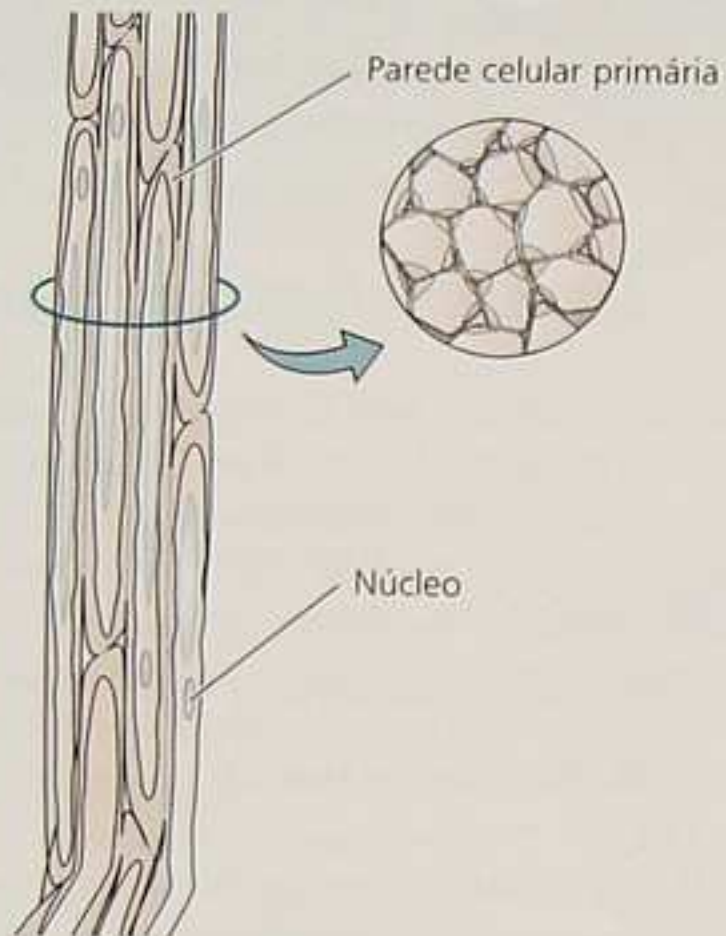
Primórdio foliar
Ápice e meristema apical da parte aérea
Gema axilar com meristema
Folha
Nó
Entrenó
Tecido vascular
Linha do solo
Raiz lateral
Raiz principal
Pêlos radiculares
Ápice da raiz com meristema apical
Coifa

(A) Folha
Cutícula
Epiderme superior (tecido dérmico)
Parênquima paliçádico (tecido fundamental)
Parênquima da bainha do feixe
Parênquima
Xilema
Floema
Tecidos vasculares
Epiderme inferior (tecido dérmico)
Célula-guarda
Estômato
Parênquima esponjoso (tecido fundamental)
Cutícula

(B) Caule
Epiderme (tecido dérmico)
Córtex
Medula
Tecidos fundamentais
Xilema
Floema
Tecidos vasculares
Câmbio vascular

(C) Raiz
Epiderme (tecido dérmico)
Córtex
Periciclo (meristema interno)
Tecidos fundamentais
Endoderme
Floema
Xilema
Tecidos vasculares
Pêlo radicular (tecido dérmico)
Câmbio vascular

Parede primária
Lamela média
Pontoação simples
Parede primária
Parede secundária
Membrana plasmática

FIGURA 1.2 Representação esquemática das paredes celulares primárias e secundárias e sua relação com o restante da célula.

◀ **FIGURA 1.3** (A) A epiderme externa (tecido dérmico) de uma folha de *Welwitschia mirabilis* (120×). Representações diagramáticas de três tipos de tecidos fundamentais: células de (B) parênquima, (C) colênquima, (D) células do esclerênquima e (E) células condutoras do xilema e do floema (A © Meckes/ Ottawa/Photo Researchers, Inc).

A CÉLULA VEGETAL

Os vegetais são organismos multicelulares, constituídos de milhões de células com funções especializadas. Na maturidade, tais células podem diferir muito umas das outras quanto às suas estruturas. Entretanto, todas elas apresentam a mesma estrutura básica da organização eucariótica: possuem um núcleo, um citoplasma e organelas subcelulares, estando envoltas por uma membrana que define seus limites (Figura 1.4). Determinadas estruturas, incluindo o núcleo, podem ser perdidas durante a maturação celular, porém todas as células vegetais *iniciam* com uma quantidade semelhante de organelas.

Um aspecto característico das células vegetais é que elas são delimitadas por uma parede celular celulósica. As seções seguintes apresentam um resumo sobre as membranas e as organelas das células vegetais. A estrutura e a função da parede celular serão abordadas no Capítulo 15.

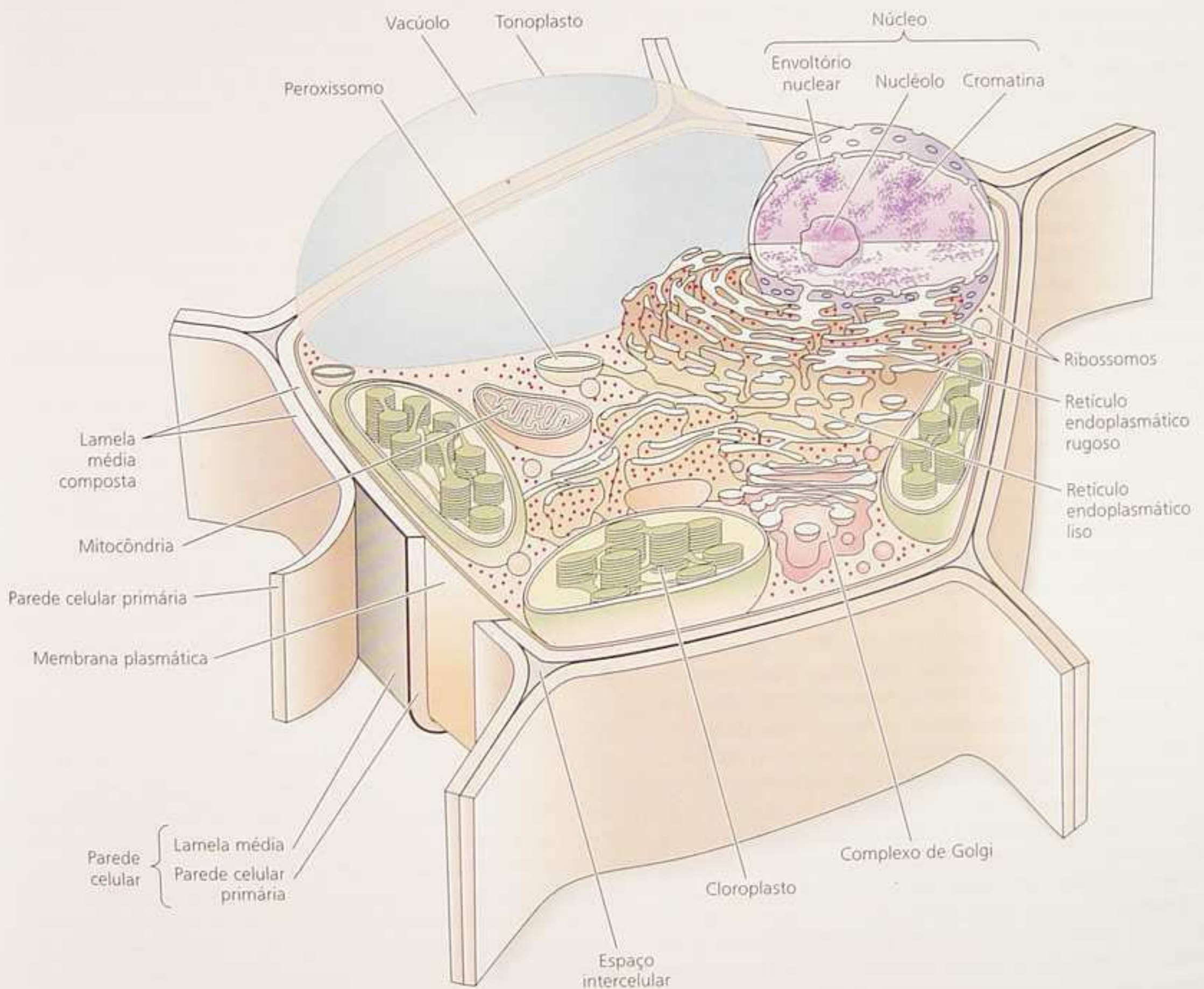



FIGURA 1.4 Diagrama de uma célula vegetal. Vários compartimentos intracelulares são delimitados por suas respectivas membranas, tais como o tonoplasto, o envoltório nuclear e as membranas das demais organelas. As duas paredes celulares primárias adjacentes, juntamente com a lamela média, formam uma estrutura complexa, denominada lamela média composta.

As membranas biológicas são bicamadas de fosfolipídeos que contêm proteínas

Todas as células são envolvidas por uma membrana que representa o seu limite, separando o citoplasma do ambiente externo. Essa **membrana plasmática** (também chamada de **plasmalema**) permite que a célula absorva e retenha certas substâncias, enquanto exclui outras. Várias proteínas de transporte presentes na membrana plasmática são responsáveis pelo tráfego seletivo de solutos através da membrana. O acúmulo de íons ou moléculas no citosol pela ação das proteínas transportadoras consome energia metabólica. As membranas também delimitam as organelas internas da célula e regulam os fluxos de íons e metabólitos para dentro e para fora de tais compartimentos.

De acordo com o **modelo do mosaico fluido**, todas as membranas biológicas apresentam a mesma organização molecular básica. Elas consistem de uma dupla camada (*bicamada*) de fosfolipídeos ou, no caso dos cloroplastos, de glicosilglicerídeos, na qual proteínas estão embebidas (Figura 1.5 A e B). As proteínas são responsáveis por cerca de metade da massa da maioria das membranas. No entanto, a constituição dos componentes lipídicos e as propriedades das proteínas variam de membrana para membrana, conferindo características funcionais específicas a cada uma.

Fosfolipídeos. Os fosfolipídeos constituem uma classe de lipídeos na qual dois ácidos graxos são covalentemente ligados ao glicerol, que, por sua vez, é covalentemente unido a um grupo fosfato. Também ligado a esse grupo fosfato encontra-se um componente variável, denominado *grupo de cabeça*, como a serina, a colina, o glicerol ou o inositol (Figura 1.5 C). Ao contrário dos ácidos graxos, os grupos da cabeça são altamente polares; conseqüentemente, as moléculas fosfolipídicas apresentam propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (i. é, são *anfipáticas*). As cadeias hidrocarbonadas não-polares dos ácidos graxos formam a região que é exclusivamente hidrofóbica — ou seja, que exclui a água.

As membranas dos plastídios são exclusivas quanto à composição lipídica, pois consistem, quase que completamente, de **glicosilglicerídeos,** em vez de fosfolipídeos. Nos glicosilglicerídeos, o grupo da cabeça polar consiste de galactose, digalactose ou galactose sulfatada, sem um grupo fosfato (ver **Tópico 1.4 na Internet**).

As cadeias de ácidos graxos dos fosfolipídeos e glicosilglicerídeos são variáveis no comprimento, mas em geral consistem de 14 a 24 carbonos. Um dos ácidos graxos é normalmente *saturado* (i. é, não contém ligações duplas); a outra cadeia de ácido graxo tem, via de regra, uma ou mais ligações duplas *cis* (i. é, é *insaturada*).

A presença de ligações duplas *cis* cria uma flexão na cadeia, o que evita o empacotamento dos fosfolipídeos na bicamada. Como resultado, a fluidez da membrana é aumentada. A fluidez, por sua vez, exerce um papel crítico em muitas das funções da membrana. Ela é fortemente influenciada pela temperatura. Visto que os vegetais não podem regular a temperatura dos seus corpos, eles freqüentemente enfrentam o problema de manter a fluidez da membrana sob condições de baixas temperaturas, as quais tendem a aumentar a compactação da membrana. Assim, os fosfolipídeos vegetais apresentam um alto percentual de ácidos graxos insaturados, como o ácido oléico (uma ligação dupla), ácido linoléico (duas ligações duplas) e α-linolênico (três ligações duplas), que aumentam a fluidez da membrana.

Proteínas. As proteínas associadas à bicamada lipídica são de três tipos: integrais, periféricas e ancoradas. As **proteínas integrais** são embebidas na bicamada lipídica. A maioria das proteínas integrais atravessa completamente a bicamada lipídica, de forma que uma parte da proteína interage com o meio extracelular, outra com o centro hidrofóbico e uma terceira parte interage com o interior da célula, o citosol. Aquelas que atuam como canais iônicos (ver Capítulo 6) são sempre proteínas integrais de membrana, da mesma forma que certos receptores que participam nas rotas de transdução de sinal (ver Capítulo 14). Algumas proteínas do tipo receptor, na superfície externa da membrana plasmática, reconhecem e se ligam firmemente aos constituintes da parede celular, estabelecendo uma ligação cruzada entre a membrana e a parede.

As **proteínas periféricas** são ligadas à superfície da membrana por ligações não-covalentes, como as iônicas ou as de hidrogênio, podendo ser dissociadas da membrana com soluções altamente salinas ou com agentes caotrópicos, que quebram as ligações iônicas e as de hidrogênio, respectivamente. Dentre as várias funções que desempenham na célula, destacam-se por exemplo, o envolvimento de algumas nas interações entre a membrana plasmática e os componentes do citoesqueleto, como os microtúbulos e os microfilamentos de actina, os quais serão discutidos posteriormente neste capítulo.

As **proteínas ancoradas** estão covalentemente ligadas à superfície da membrana por meio das moléculas de lipídeos. Esses lipídeos incluem os ácidos graxos (ácidos mirístico e palmítico), grupos prenil derivados da rota dos isoprenóides (grupos farnesil e geranilgeranil) e o glicosilfosfatidilinositol (proteínas ancoradas por GPI) (Figura 1.6) (Buchanan e cols., 2000).

O núcleo contém a maioria do material genético da célula

O **núcleo** é a organela que contém a informação genética responsável pela regulação do metabolismo, crescimento e diferenciação da célula. Coletivamente, tais genes e suas seqüências interpostas são referidos como o **genoma nuclear**. O tamanho do genoma nuclear nos vegetais é altamente variável, podendo ser de aproximadamente $1{,}2 \times 10^8$ pares de bases na pequena dicotiledônea *Arabidopsis thaliana* até 1×10^{11} pares de bases no lírio *Fritillaria assyriaca*. A informação genética restante da célula está contida em duas organelas semi-autônomas — os cloroplastos e as mitocôndrias — as quais serão discutidas posteriormente neste capítulo.

O núcleo é limitado por uma dupla membrana denominada **envoltório nuclear** (Figura 1.7A). O espaço entre as duas membranas do envoltório nuclear é denominado **espaço perinuclear** e as duas membranas do envoltório unem-se em determinados pontos, formando os **poros nucleares** (Figura 1.7B). O "poro" nuclear é verdadeiramente uma estrutura elaborada, composta de mais de uma centena de proteínas diferentes organizadas em simetria octogonal, formando o complexo do poro nuclear (Figura 1.8). O número de complexos de poros presentes em um único envoltório pode variar de poucos a milhares. Uma estrutura central do complexo atua como um transportador ativo (dirigido por ATP), que facilita o movimento de macromoléculas e subunidades ribossômicas tanto para dentro quanto para fora do núcleo (o transporte ativo será discutido em detalhes no Capítulo 6). Uma seqüência específica de aminoácidos, denominada **sinal de localização nuclear**, é necessária para que uma proteína entre no núcleo.

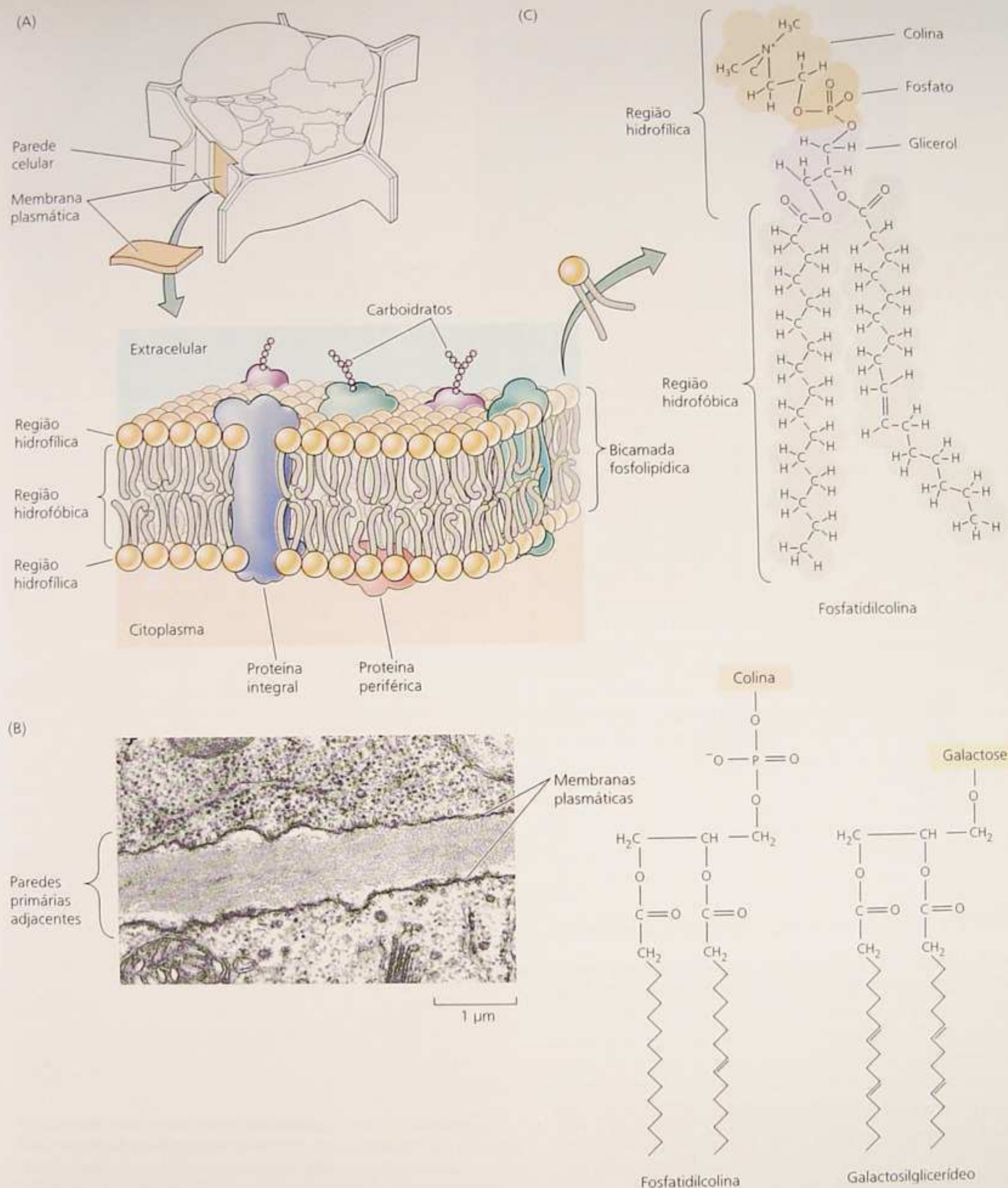



FIGURA 1.5 (A) A membrana plasmática, o retículo endoplasmático e outras endomembranas das células vegetais consistem de proteínas embebidas em uma bicamada fosfolipídica. (B) Esta electromicrografia de transmissão mostra membranas plasmáticas em células da região meristemática do ápice da raiz de agrião (*Lepidium sativum*). A espessura da membrana plasmática, visualizada como duas linhas densas e um espaço intermediário, é de 8 nm. (C) Estruturas químicas e modelos de espaço preenchido de espaços de fosfolipídeos típicos: fosfatidilcolina e galactosilglicerídeo (B, Gunning e Steer, 1996).

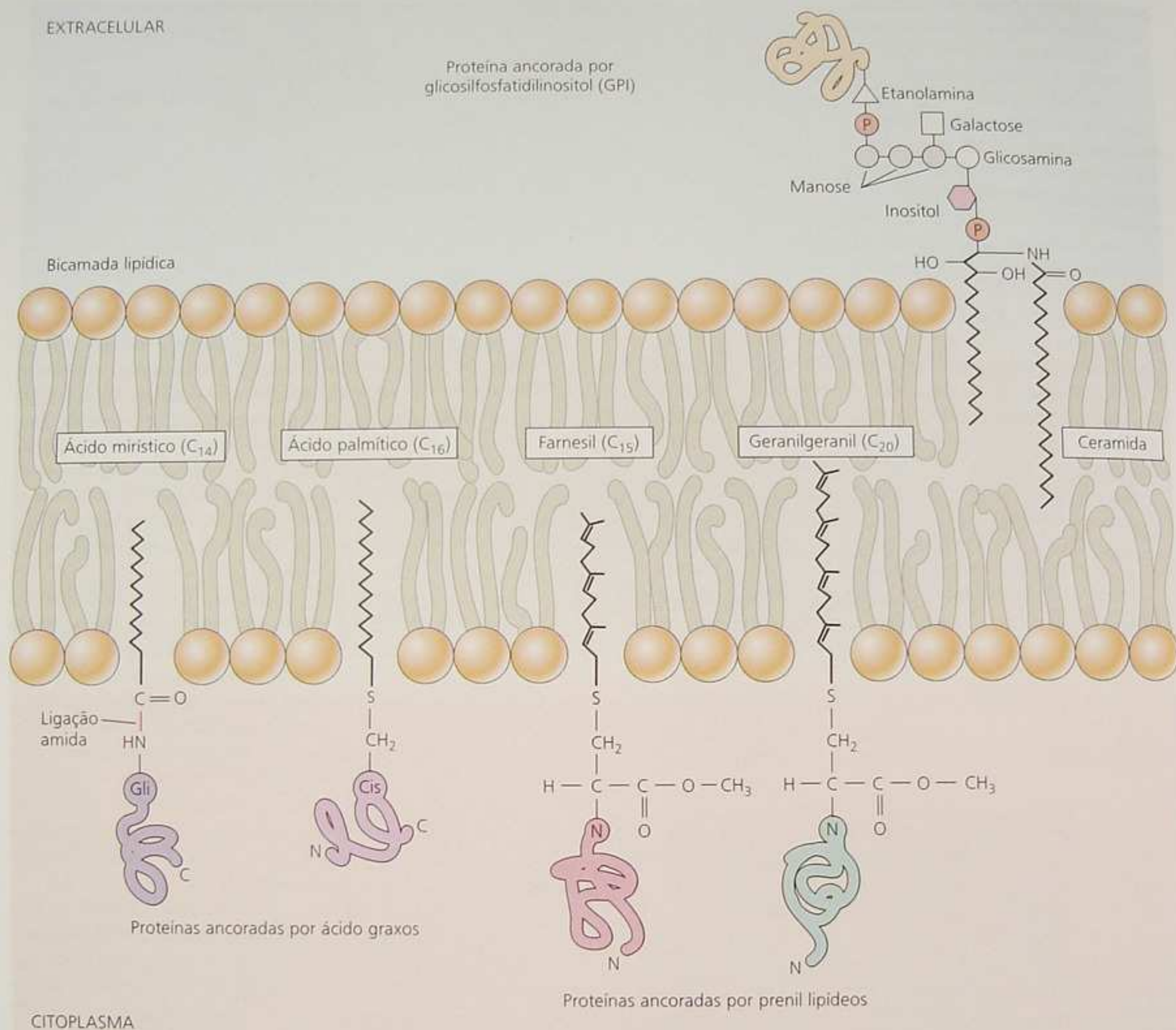



FIGURA 1.6 Diferentes tipos de proteínas ancoradas, que estão ligadas à membrana plasmática por ácidos graxos, grupos prenil ou fosfatidilinositol (Buchanan e cols., 2000).

O núcleo é o local de armazenamento e replicação dos **cromossomos**, constituídos de DNA e suas proteínas associadas. Este complexo, formado de DNA e proteínas, é conhecido como **cromatina.** O comprimento linear de todo o DNA em qualquer genoma vegetal é, com freqüência, milhões de vezes maior que o diâmetro do núcleo no qual se encontra. Para solucionar o problema de compactação do DNA cromossômico no núcleo, a seqüência linear da dupla hélice de DNA enrola-se duas vezes em torno de um sólido cerne de oito moléculas de proteínas histonas, formando um **nucleossomo**. Os nucleossomos são organizados como um "colar de contas" ao longo do comprimento de cada cromossomo.

Durante a mitose, a cromatina condensa-se inicialmente por um forte espiralamento em uma **fibra de cromatina de 30 nm**, com seis nucleossomos por volta, seguido por processos adicionais de dobramento e compactação, que dependem de interações entre as proteínas e os ácidos nucléicos (Figura 1.9). Na interfase, dois tipos de cromatina podem ser visualizados: a heterocromatina e a eucromatina. Cerca de 10% do DNA consiste de **heterocromatina**, uma forma de cromatina altamente compacta e não transcrita. O restante do DNA consiste de **eucromatina**, uma forma descondensada e ativa, em termos de transcrição. Somente cerca de 10% da eucromatina é transcricionalmente ativa em um determinado tem-

(A) (B)

Envoltório nuclear
Nucléolo
Cromatina

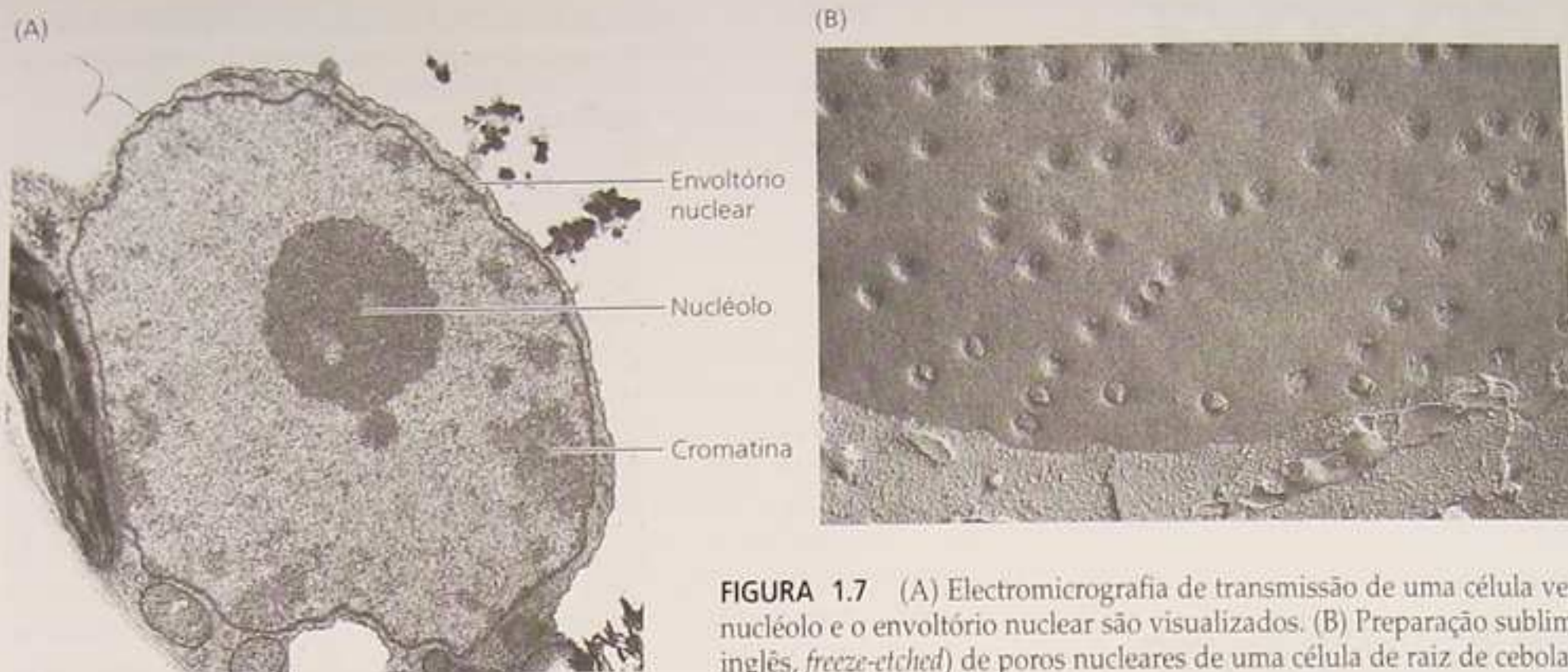



FIGURA 1.7 (A) Electromicrografia de transmissão de uma célula vegetal, onde o nucléolo e o envoltório nuclear são visualizados. (B) Preparação sublimada com gelo (do inglês, *freeze-etched*) de poros nucleares de uma célula de raiz de cebola (A, cedida por R. Evert; B, cedida por D. Branton).

CITOPLASMA
Complexo do poro nuclear
120 nm
Anel citoplasmático
Fibrila citoplasmática
Membrana nuclear externa
Subunidade anelar radial
Anel nuclear
Membrana nuclear interna
"Cesto" nuclear
Transportador central
NUCLEOPLASMA

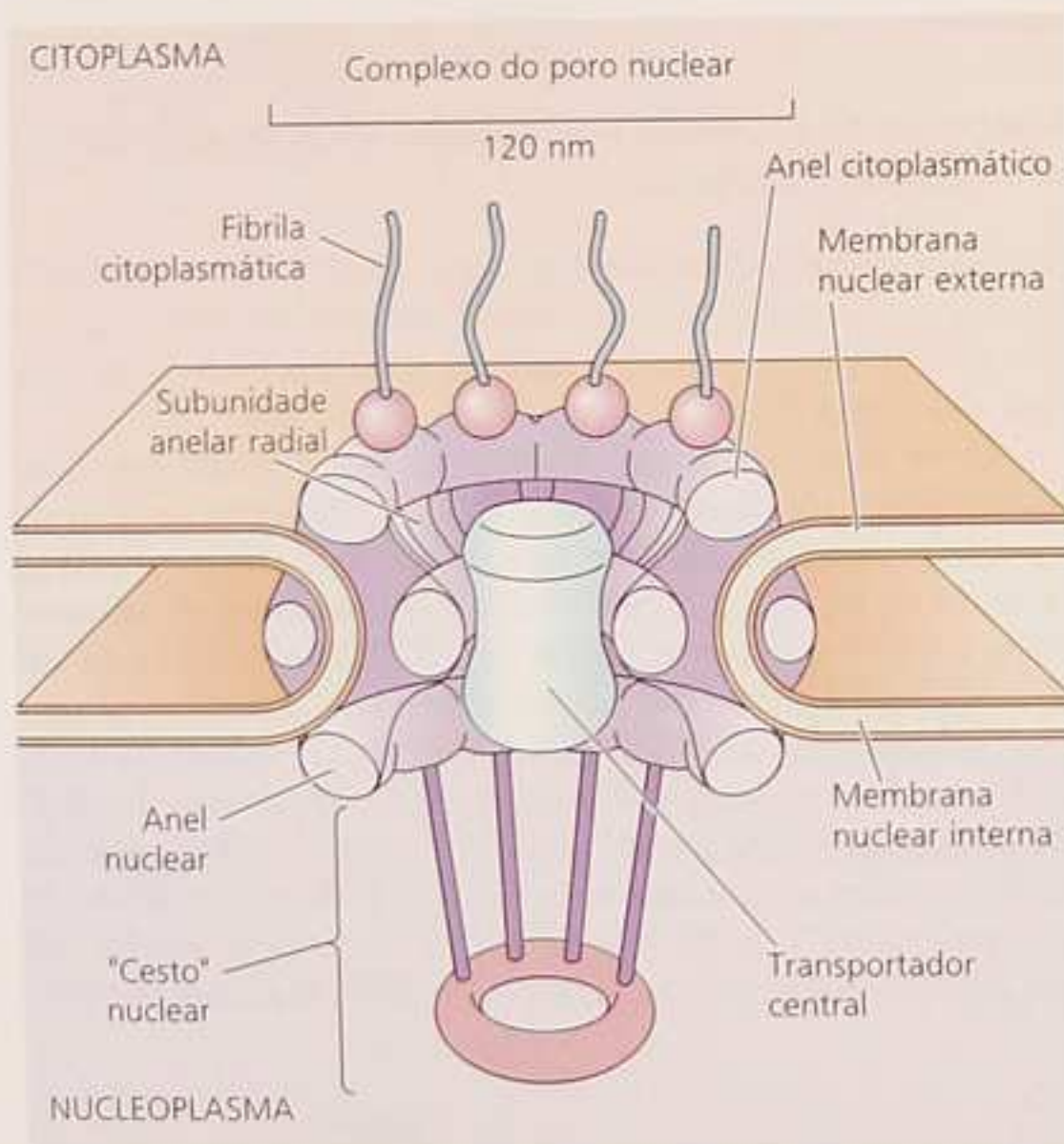



FIGURA 1.8 Modelo esquemático da estrutura de um complexo do poro nuclear. Cada um dos anéis paralelos é composto de oito subunidades, organizadas em simetria octogonal, contíguos às membranas interna e externa do envoltório nuclear. Várias proteínas formam as outras estruturas, como o anel nuclear, subunidade anelar radial, o transportador central, as fibrilas citoplasmáticas e o "cesto" nuclear.

po. O restante ocorre em um estado intermediário de condensação, entre heterocromatina e a eucromatina transcricionalmente ativa.

O núcleo contém uma região densamente granular, denominada **nucléolo,** que é o sítio de síntese dos ribossomos (Figura 1.7A). O nucléolo inclui porções de um ou mais cromossomos onde os genes do RNA ribossômico (rRNA) estão agrupados, formando uma região chamada de **organizadora de nucléolo**. As células típicas apresentam um ou mais nucléolos por núcleo. Cada ribossomo 80S é formado por uma subunidade maior e uma menor e cada subunidade é um complexo formado por rRNA e proteínas específicas. As duas subunidades saem do núcleo separadamente, através do poro nuclear e unem-se no citoplasma para formar um ribossomo completo (Figura 1.10A). Os **ribossomos** são os sítios da síntese protéica.

A síntese de proteínas envolve a transcrição e a tradução

O complexo processo de síntese protéica inicia com a **transcrição** — a síntese de uma molécula de RNA que possui uma seqüência de bases complementar a um gene específico. O RNA transcrito é processado para se tornar um RNA mensageiro (mRNA), o qual se move do núcleo para o citoplasma. No citoplasma, o mRNA liga-se inicialmente à subunidade menor do ribossomo e, então, à subunidade maior para iniciar a tradução.

A **tradução** é o processo pelo qual ocorre a síntese de uma proteína específica a partir de aminoácidos, de acordo com a seqüência codificada pelo mRNA. O ribossomo movimenta-se ao longo do mRNA e serve como sítio de ligação seqüencial de aminoácidos, conforme especificado pela seqüência de bases do mRNA (Figura 1.10B).

DNA dupla hélice
2 nm
DNA espaçador
Histonas
Nucleossomo
11 nm
Nucleossomos ("colar de contas")
30 nm
Nucleossomo
Fibra de cromatina de 30 nm
300 nm
Domínios em alça
700 nm
Cromatina condensada
Cromátides
1.400 nm
Cromossomo metafásico duplicado, altamente condensado, de uma célula em divisão

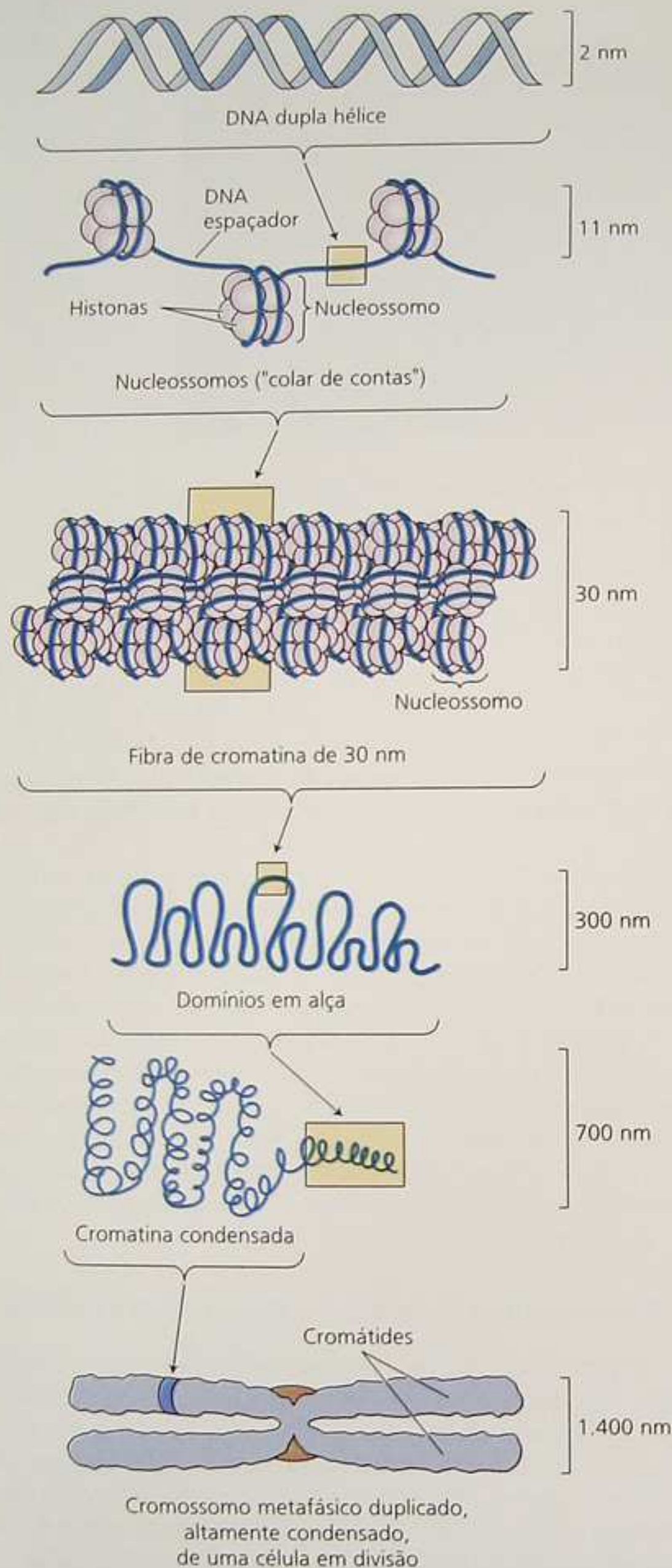



FIGURA 1.9 Compactação do DNA em um cromossomo metafásico. O DNA é inicialmente compactado em nucleossomos e, então, sofre uma organização helicoidal para formar fibras de cromatina de 30 nm. Torções adicionais levam ao cromossomo metafásico condensado (Alberts e cols., 2002).

O retículo endoplasmático é uma rede de endomembranas

As células apresentam uma rede organizada de membranas internas, denominadas **retículo endoplasmático (RE),** cujas membranas são bicamadas lipídicas típicas com proteínas integrais e periféricas intercaladas. Tais membranas formam sáculos achatados ou tubulares, as **cisternas.**

Os estudos de ultra-estrutura têm mostrado que o retículo é contínuo com a membrana externa do envoltório nuclear. Há dois tipos de retículo: o liso e o rugoso (Figura 1.11) — ambos interconectados. O **RE rugoso (RER)** difere do liso por apresentar ribossomos na sua superfície, os quais estão relacionados à síntese de proteínas; além disso, o RE rugoso tende a ser lamelar (lâminas achatadas compostas de duas unidades de membrana), enquanto o liso tende a ser tubular, embora possa ser observada uma transição gradual entre os dois tipos, em quase todas as células.

As diferenças estruturais entre as duas formas do RE são acompanhadas de diferenças funcionais. O **RE liso** atua como o principal sítio de síntese de lipídeos e formação de membranas. Já o rugoso é o local de síntese de proteínas de membrana e proteínas para serem secretadas para o exterior da célula ou para os vacúolos.

A secreção de proteínas pelas células inicia no retículo endoplasmático rugoso

As proteínas destinadas à secreção atravessam a membrana do RER e entram no lume do retículo. Esta é a primeira etapa na rota de secreção, que envolve também o complexo de Golgi e as vesículas que se fusionam à membrana plasmática.

O mecanismo de transporte através da membrana é complexo, envolvendo os ribossomos, o mRNA que codifica a proteína de secreção e um receptor especial na membrana do retículo. Todas as proteínas de secreção e a maioria das proteínas integrais de membrana apresentam uma seqüência hidrofóbica de 18 a 30 resíduos de aminoácidos na extremidade aminoterminal da cadeia. Durante a tradução, esta seqüência-líder, denominada **seqüência-sinal,** é reconhecida por uma **partícula de reconhecimento de sinal (PRS),** constituída de proteína e RNA, facilitadora da ligação do ribossomo livre às proteínas **receptoras de PRS** (ou "proteínas de posicionamento") no RE (Figura 1.10A). O peptídeo sinal é responsável pelo transporte do polipeptídeo nascente através da mem-

FIGURA 1.10 (A) Etapas básicas da expressão gênica, incluindo a transcrição, o processamento, a exportação dos RNAs para o citoplasma e a tradução. As proteínas podem ser sintetizadas nos ribossomos livres ou nos ribossomos ligados à membrana do retículo. As proteínas de secreção, contendo uma seqüência sinal hidrofóbica, ligam-se à partícula de reconhecimento de sinal (PRS) no citosol. O complexo ribossomo-PRS move-se em direção ao retículo endoplasmático, onde se liga ao receptor da PRS. A tradução continua e o polipeptídeo formado é liberado no lume do retículo endoplasmático. O peptídeo-sinal é clivado, os açúcares são adicionados e a glicoproteína é transportada para o Golgi através de vesículas. (B) Os aminoácidos são polimerizados no ribossomo, com o auxílio do tRNA, para formar a cadeia polipeptídica nascente. ▶

(A)

Núcleo
Citoplasma
DNA
Transcrição
Íntron
Éxon
RNA transcrito
Processamento
Poli-A
Cap
RNA
Poro nuclear
Envoltório nuclear
rRNA
mRNA
tRNA
Amino-ácidos
Poli-A
Cap
mRNA
tRNA
Subunidades ribossômicas
Poli-A
Ribossomo
Tradução

Síntese de proteínas nos ribossomos livres no citoplasma

Síntese de proteínas nos ribossomos ligados ao retículo endoplasmático; o polipeptídeo entra no lume do retículo

Poli-A
Cap
Poli-A
Cap
Seqüência sinal
Partícula de reconhecimento de sinal (PRS)

Polipeptídeos livres no citoplasma

Processamento e glicosilação no complexo de Golgi, separação e secreção de proteínas

Polipeptídeo
Vesícula de transporte
Liberação da PRS
Poli-A
Cap
Poli-A
Cap
Receptor PRS
Clivagem da seqüência sinal
Cadeia lateral de carboidrato
Retículo endoplasmático rugoso

(B)

Arg
Gly
Ser
Val
Phe
Cadeia polipeptídica
tRNA
Sítio P
Ser
CAG
Sítio E
AAA
Sítio A
AGG
5′ m7G AGC GUC UUU UCC GCC UGA 3′
mRNA
Ribossomo

Polirribossomo

Ribossomos

(A) RE rugoso (vista frontal)

(C) RE liso

(B) RE rugoso (secção transversal)

FIGURA 1.11 Retículo endoplasmático. (A) RE rugoso pode ser observado em vista frontal nesta micrografia da alga *Bulbochaete*. Os polirribossomos (muitos ribossomos ligados ao RNA mensageiro) do RE são bastante visíveis (75.000×). (B) Várias unidades de retículo endoplasmático rugoso regularmente organizadas (seta branca) nos tricomas glandulares de *Coleus blumei*. A membrana plasmática está indicada por uma seta preta e o material externo à membrana plasmática é a parede celular (75.000×). (C) RE liso freqüentemente forma uma rede tubular, conforme ilustrado nesta electromicrografia de transmissão de uma pétala jovem de *Primula kewensis* (45.000×) (fotografias de Gunning e Steer, 1996).

brana do RE em direção ao lume (no caso de proteínas integrais de membrana, uma parte do polipeptídeo completo permanece embebida na membrana).

Uma vez dentro do lume do RE, a seqüência-sinal é clivada por uma peptidase sinal. Em alguns casos, uma cadeia ramificada de oligossacarídeos, formada de *N*-acetilglicosamina (GlcNac), manose (Man) e glicose (Glc), apresentando a estequiometria $GlcNac_2Man_9Glc_3$, é ligada ao grupo aminolateral livre de uma asparagina. Esse carboidrato produzido é denominado *oligossacarídeo ligado a N* (Faye e cols., 1992). Os três resíduos terminais de glicose são então removidos por glicosidases específicas e a glicoproteína processada (i. é, a proteína com açúcares ligados covalentemente) está pronta para ser transportada para o complexo de Golgi. As **glicoproteínas N-ligadas** são, então, transportadas para o complexo de Golgi por meio de pequenas vesículas, as quais se movem pelo citosol e fusionam-se com a cisterna na face *cis* do complexo de Golgi (Figura 1.12).

As proteínas e os polissacarídeos para secreção são processados no complexo de Golgi

O **complexo de Golgi** das células vegetais é uma estrutura dinâmica, que consiste de uma ou mais pilhas de três a dez sáculos membranosos achatados, ou cisternas, e uma rede irregular de túbulos e vesículas denominada **rede *trans* do Golgi (RTG)** (Figura 1.12). Cada pilha individual é chamada de **corpo de Golgi** ou **dictiossomo.**

Tal como ilustra a Figura 1.12, o dictiossomo apresenta regiões distintas: as cisternas próximas à membrana plasmática são denominadas face *trans* e as cisternas próximas ao centro da célula

FIGURA 1.12 Electromicrografia do complexo de Golgi de células da coifa da raiz de tabaco (*Nicotiana tabacum*). As cisternas *cis*, *mediana* e *trans* estão indicadas. A rede *trans* do Golgi está associada com as cisternas *trans* (60.000×) (Gunning e Steer, 1996).

chamam-se de face *cis*. As cisternas *medianas* localizam-se entre as cisternas *trans* e as *cis*. A rede *trans* do Golgi está situada na face *trans*. A estrutura completa é estabilizada pela presença de **elementos intercisternas,** que são ligações cruzadas de proteínas que mantêm as cisternas unidas. Enquanto nas células animais os dictiossomos tendem a se agrupar em uma parte da célula e são interconectados por túbulos, as células vegetais contêm até várias centenas de dictiossomos aparentemente separados, dispersos no citoplasma (Driouich e cols., 1994).

O complexo de Golgi desempenha um papel fundamental na síntese e na secreção de polissacarídeos complexos (polímeros compostos de diferentes tipos de açúcares) e na adição de cadeias laterais de oligossacarídeos nas glicoproteínas (Driouich e cols., 1994). Conforme já mencionado, as cadeias polipeptídicas das futuras glicoproteínas são inicialmente sintetizadas no RE rugoso, atravessam a membrana do RE e são glicosiladas nos grupos $-NH_2$ dos resíduos de asparagina. As modificações e as adições posteriores das cadeias laterais de oligossacarídeos são realizadas no Golgi. As glicoproteínas destinadas à secreção chegam ao Golgi por meio de vesículas que brotam do RER.

A rota exata das glicoproteínas pelo complexo de Golgi ainda não é conhecida. Visto que parece não haver continuidade direta de membranas entre as sucessivas cisternas, os conteúdos de uma cisterna são transferidos para a próxima cisterna por intermédio de pequenas vesículas que brotam das suas margens, similar ao que ocorre no complexo de Golgi das células animais. Em alguns casos, entretanto, cisternas inteiras podem avançar pelo Golgi e emergir na face *trans*.

Nos lumes das cisternas do Golgi, as glicoproteínas são enzimaticamente modificadas. Alguns açúcares, como a manose, são removidos das cadeias oligossacarídicas e outros açúcares são adicionados. Além dessas modificações, a glicosilação dos grupos –OH dos resíduos de hidroxiprolina, serina, treonina e tirosina (**oligossacarídeos ligados a O)** também ocorre no Golgi. Após serem ali processadas, as glicoproteínas deixam essa organela em outras vesículas, em geral a partir da face *trans* da pilha. Todo esse processamento parece conferir a cada proteína uma identificação ou marca particular, a qual especifica o destino final daquela proteína, dentro ou fora da célula.

Nas células vegetais, o Golgi desempenha um papel importante na formação da parede celular (ver Capítulo 15). Nessa organela, são sintetizados os polissacarídeos não-celulósicos da parede celular (hemicelulose e pectina) e várias glicoproteínas são processadas, incluindo as glicoproteínas ricas em hidroxiprolina.

As **vesículas secretoras** derivadas do Golgi transportam os polissacarídeos e as glicoproteínas até a membrana plasmática, com a qual as vesículas fusionam-se e esvaziam seus conteúdos na região da parede celular. As vesículas secretoras podem ser lisas ou ter um revestimento protéico. As vesículas que brotam do RE são geralmente lisas. A maioria das vesículas que brotam do Golgi é revestida por algum tipo de proteína, a qual auxilia no processo de brotamento durante a formação da vesícula. As vesículas envolvidas no tráfego do RE para o Golgi, entre as cisternas do Golgi e do Golgi para a RTG, apresentam **revestimento protéico.** As **vesículas revestidas de clatrina** (Figura 1.13) estão relacionadas ao transporte de proteínas de reserva do Golgi para vacúolos especializados no armazenamento de proteínas. Elas também participam da **endocitose,** processo que engloba proteínas solúveis ou proteínas ligadas à membrana.

O vacúolo central contém água e solutos

As células vegetais vivas e maduras apresentam grandes vacúolos centrais, que podem ocupar de 80 a 90% do seu volume total (Figura 1.4). Cada vacúolo é delimitado por uma **membrana vacuolar** ou **tonoplasto**. Muitas células também apresentam filamentos citoplasmáticos que atravessam o vacúolo, mas cada filamento transvacuolar é envolto pelo tonoplasto.

Nos tecidos meristemáticos, os vacúolos são menos proeminentes, embora estejam sempre presentes como pequenos prova-

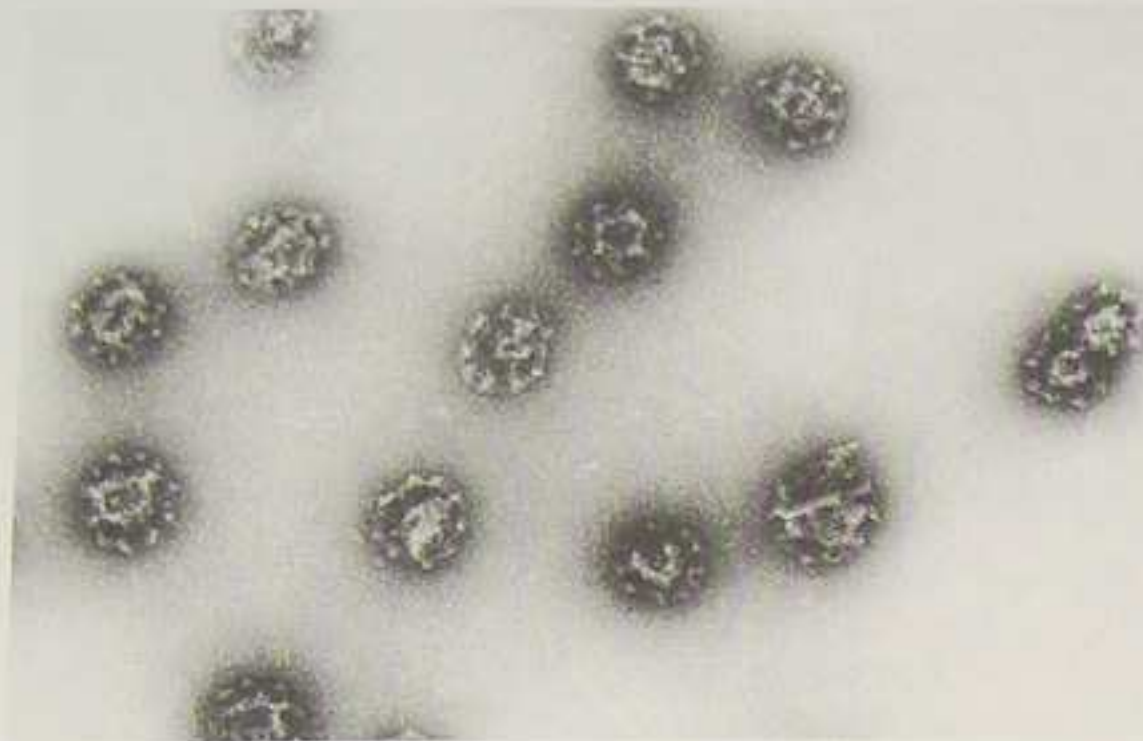



FIGURA 1.13 Preparação de vesículas revestidas de clatrina, isoladas de folhas do feijoeiro (102.000×) (fotografia cedida por D. G. Robinson).

FIGURA 1.14 Fotomicrografia de um protoplasto preparado a partir da camada de aleurona de sementes. O corante fluorescente revela dois tipos de vacúolos: os maiores, corpos protéicos e os menores, vacúolos líticos (fotografia cedida por P. Bethke e R. L. Jones).

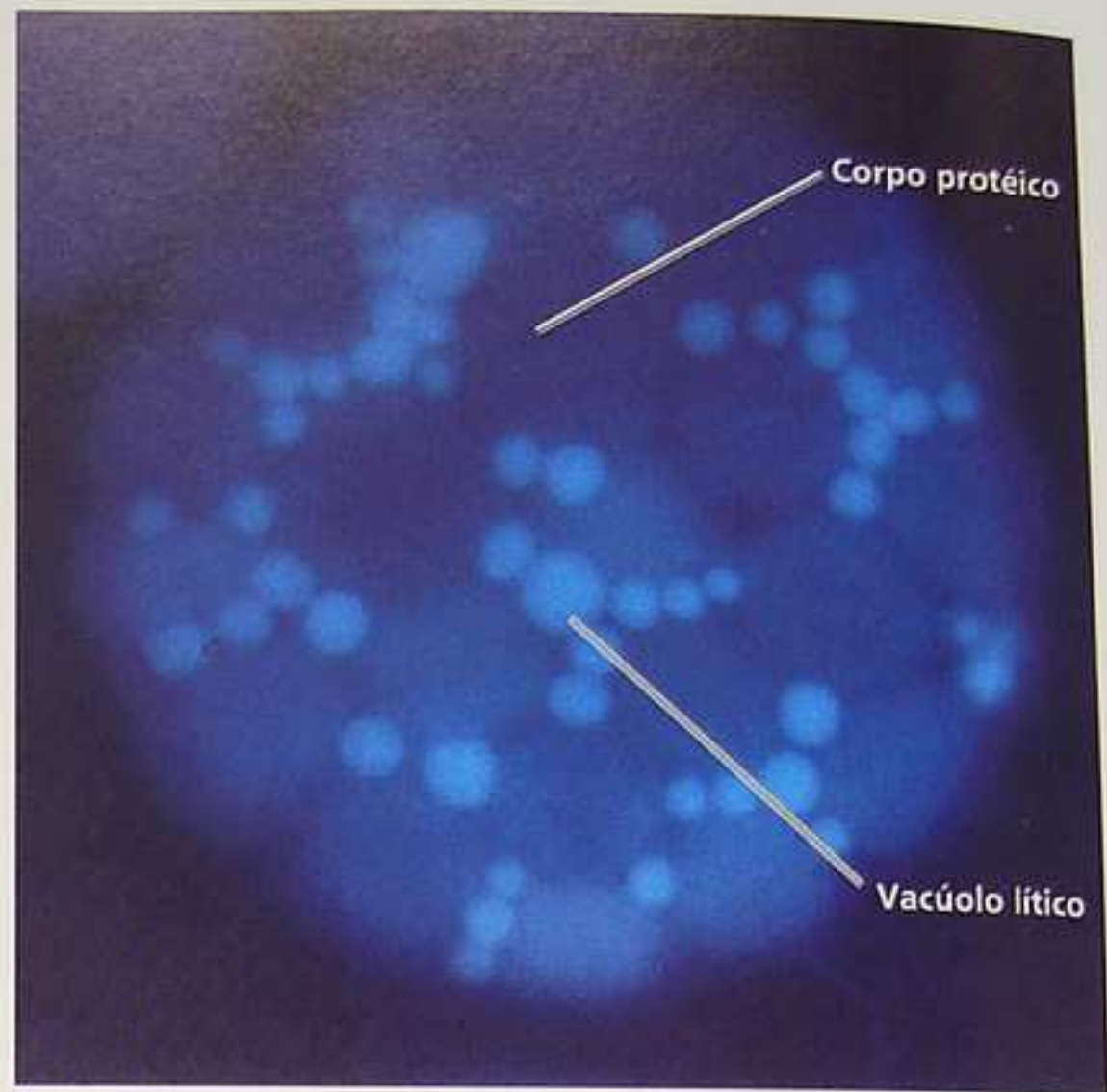
cúolos, os quais são produzidos pela rede *trans* do Golgi (ver Figura 1.12). À medida que as células iniciam a maturação, os provacúolos fusionam-se, formando grandes vacúolos centrais característicos da maioria das células vegetais maduras. Em tais células, o citoplasma está restrito a uma fina camada ao redor do vacúolo.

O vacúolo contém água e íons inorgânicos dissolvidos, ácidos orgânicos, açúcares, enzimas e vários metabólitos secundários (ver Capítulo 13), os quais, muitas vezes, exercem funções na defesa vegetal. O acúmulo ativo de solutos produz uma força osmótica para a absorção de água pelo vacúolo, que é necessária para a expansão da célula vegetal. A pressão de turgor gerada por essa absorção de água proporciona a rigidez estrutural necessária para manter uma planta herbácea ereta, pois as mesmas não apresentam tecidos de sustentação lignificados como as plantas lenhosas.

Assim como os lisossomos animais, os vacúolos vegetais contêm enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, ribonucleases e glicosidases. Entretanto, ao contrário dos lisossomos animais, os vacúolos vegetais não participam da degradação de macromoléculas durante o ciclo vital da célula. Em vez disso, suas enzimas de degradação passam para o citoplasma à medida que a célula entra em senescência, auxiliando, assim, a reciclagem de nutrientes valiosos para a parte viva da planta.

Vacúolos especializados no armazenamento de proteínas, denominados **corpos protéicos**, são abundantes em sementes. Durante a germinação, as proteínas de reserva dos corpos protéicos são hidrolisadas a aminoácidos e exportadas para o citosol para serem utilizadas na síntese protéica. As enzimas hidrolíticas são armazenadas em **vacúolos líticos** especializados, os quais se fusionam aos corpos protéicos para iniciar o processo de hidrólise (Figura 1.14).

As mitocôndrias e os cloroplastos são sítios de conversão de energia

Uma célula vegetal típica apresenta dois tipos de organelas produtoras de energia: as mitocôndrias e os cloroplastos. Ambos os tipos estão separados do citosol por uma dupla membrana (uma interna e outra externa). As **mitocôndrias** são os sítios celulares da respiração, um processo no qual a energia liberada pelo metabolismo do açúcar é usada para a síntese de ATP (trifosfato de adenosina) a partir do ADP (difosfato de adenosina) e do fosfato inorgânico (P_i) (ver Capítulo 11).

As mitocôndrias variam da forma esférica à tubular, mas todas apresentam uma membrana externa lisa e uma membrana interna altamente convoluta (Figura 1.15). Tais invaginações da membrana interna são denominadas **cristas**. O compartimento delimitado pela membrana interna, a **matriz** mitocondrial, contém as enzimas da rota do metabolismo intermediário, denominado ciclo de Krebs.

Ao contrário da membrana mitocondrial externa e de todas as demais membranas da célula, a membrana interna da mitocôndria apresenta quase 70% de proteína e contém alguns fosfolipídeos que são únicos da organela (p. ex., cardiolipina). As proteínas localizadas sobre a membrana ou nela embebidas apresentam atividades especiais de transporte e enzimáticas.

A membrana interna é altamente impermeável à passagem de H^+, ou seja, ela atua como uma barreira ao movimento de prótons. Tal característica permite a formação de gradientes eletroquímicos. A dissipação desses gradientes pela enzima transmembrana **ATP sintase** está associada à fosforilação do ADP para formar ATP. O ATP pode, então, ser disponibilizado para outras regiões celulares, onde a energia é necessária para a realização de reações específicas.

Os **cloroplastos** (Figura 1.16A) pertencem a um outro grupo de organelas envolvidas por dupla membrana, denominadas **plastídeos.** As membranas do cloroplasto são ricas em glicosilglicerídeos (ver Tópico 1.4 na Internet), contêm clorofila e suas moléculas associadas e constituem o sítio da fotossíntese. Além das membra-

(A)

(B)

Espaço intermembranas
Membrana externa
Membrana interna
ADP
+
P
ATP
H^+
Matriz
Cristas

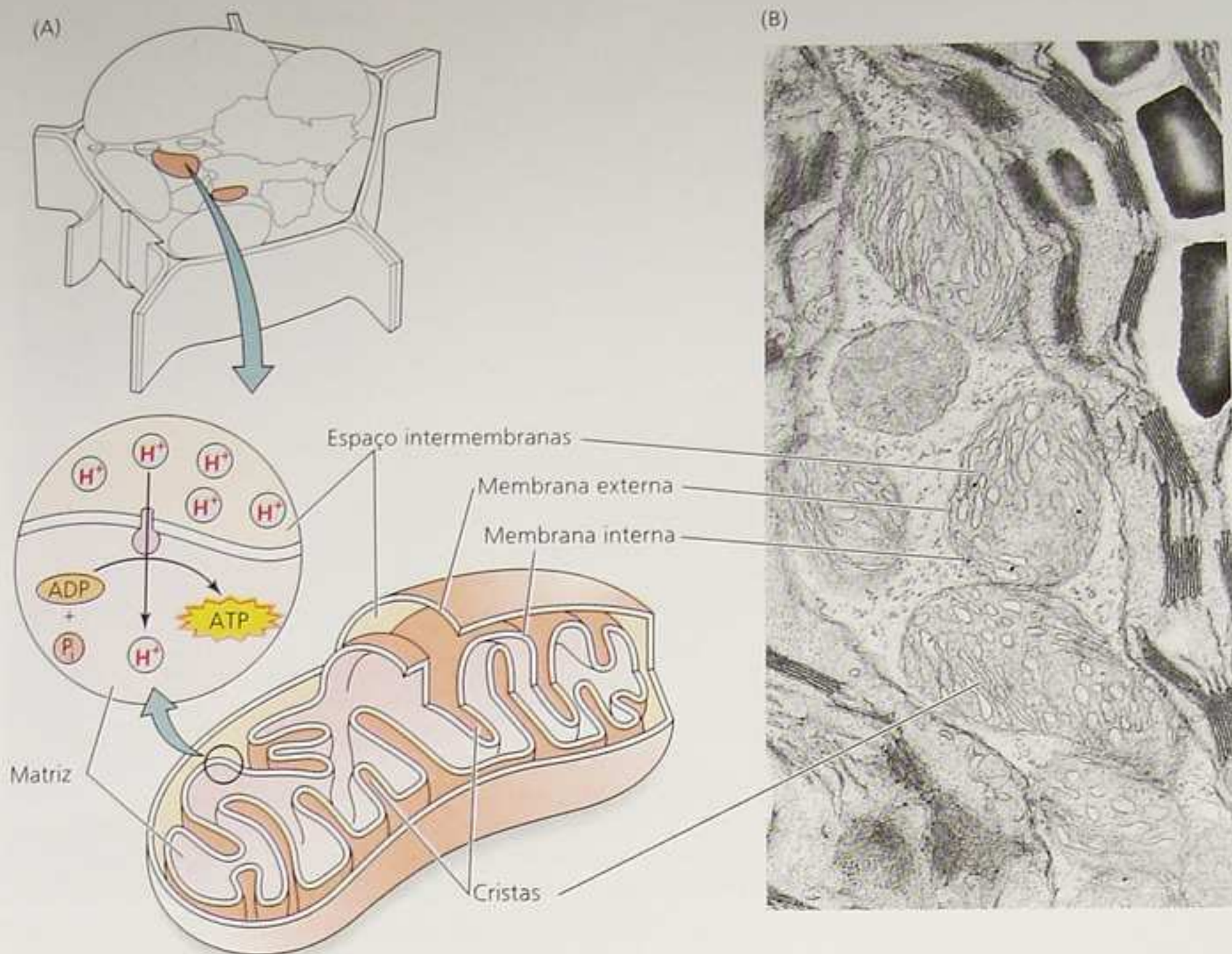



FIGURA 1.15 (A) Diagrama de uma mitocôndria, incluindo a localização da H^+-ATPase relacionada à síntese de ATP na membrana interna. (B) Uma electromicrografia da mitocôndria de uma célula da folha da grama Bermuda (*Cynodon dactylon*) (26.000×) (fotografia de S. E. Frederick, cedida por E. H. Newcomb).

nas interna e externa, os cloroplastos têm um terceiro sistema de membranas, os **tilacóides.** Uma pilha de tilacóides forma um *granum* (plural, *grana*) (Figura 1.16B). As proteínas e os pigmentos (clorofilas e carotenóides), que atuam nos eventos fotoquímicos da fotossíntese, estão embebidos na membrana do tilacóide. O compartimento fluido que circunda os tilacóides, o **estroma,** é análogo à matriz mitocondrial. Os *grana* adjacentes estão conectados por membranas, as **lamelas do estroma.**

Os diferentes componentes do aparelho fotossintético estão localizados em áreas diferentes dos *grana* e das lamelas do estroma. As ATPs sintases do cloroplasto localizam-se nas membranas dos tilacóides (ver Figura 1.16 C). Durante a fotossíntese, as reações de transferência de elétrons desencadeadas pela luz resultam em um gradiente de prótons pela membrana do tilacóide. Assim como na mitocôndria, o ATP é sintetizado quando o gradiente de prótons é dissipado pela ATP sintase.

Os plastídeos que contêm maiores concentrações de pigmentos carotenóides do que de clorofila são chamados de **cromoplastos.** Eles são um dos responsáveis pelas cores amarela, laranja ou vermelha de muitos frutos e flores, assim como das folhas no outono (ver Figura 1.17).

Os plastídeos sem pigmentos são os **leucoplastos.** O tipo mais importante de leucoplasto é o **amiloplasto,** um plastídeo de reserva de amido. Os amiloplastos são abundantes nos tecidos de partes aéreas, além de raízes e em sementes. Os amiloplastos especializados da coifa atuam como sensores de gravidade, promovendo o crescimento da raiz em direção ao solo (ver Capítulo 19).

As mitocôndrias e os cloroplastos são organelas semiautônomas

Tanto as mitocôndrias quanto os cloroplastos contêm seu próprio DNA e a maquinaria para a síntese protéica (ribossomos, RNAs transportadores e outros componentes) e parecem ter evoluído a partir de bactérias endossimbiontes. Os plastídeos e as mitocôndrias dividem-se por fissão, e as mitocôndrias podem passar por extensas fusões para formar estruturas alongadas ou redes.

O DNA de tais organelas está na forma de cromossomos circulares, semelhantes aos encontrados em bactérias e muito diferentes dos cromossomos lineares do núcleo. Esses DNAs circulares estão localizados em regiões específicas da matriz mitocondrial ou

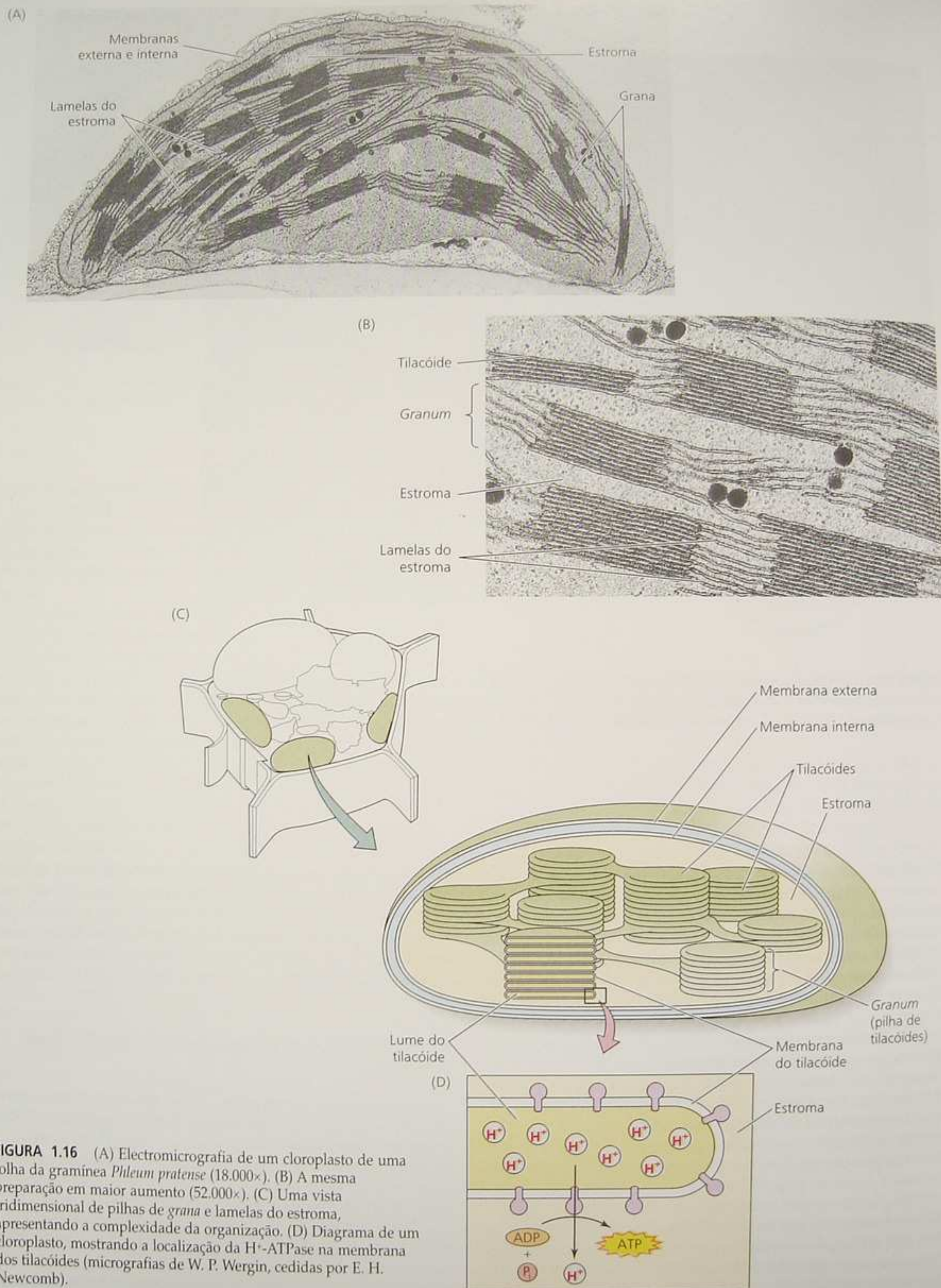



FIGURA 1.16 (A) Electromicrografia de um cloroplasto de uma folha da gramínea *Phleum pratense* (18.000×). (B) A mesma preparação em maior aumento (52.000×). (C) Uma vista tridimensional de pilhas de *grana* e lamelas do estroma, apresentando a complexidade da organização. (D) Diagrama de um cloroplasto, mostrando a localização da H^+-ATPase na membrana dos tilacóides (micrografias de W. P. Wergin, cedidas por E. H. Newcomb).

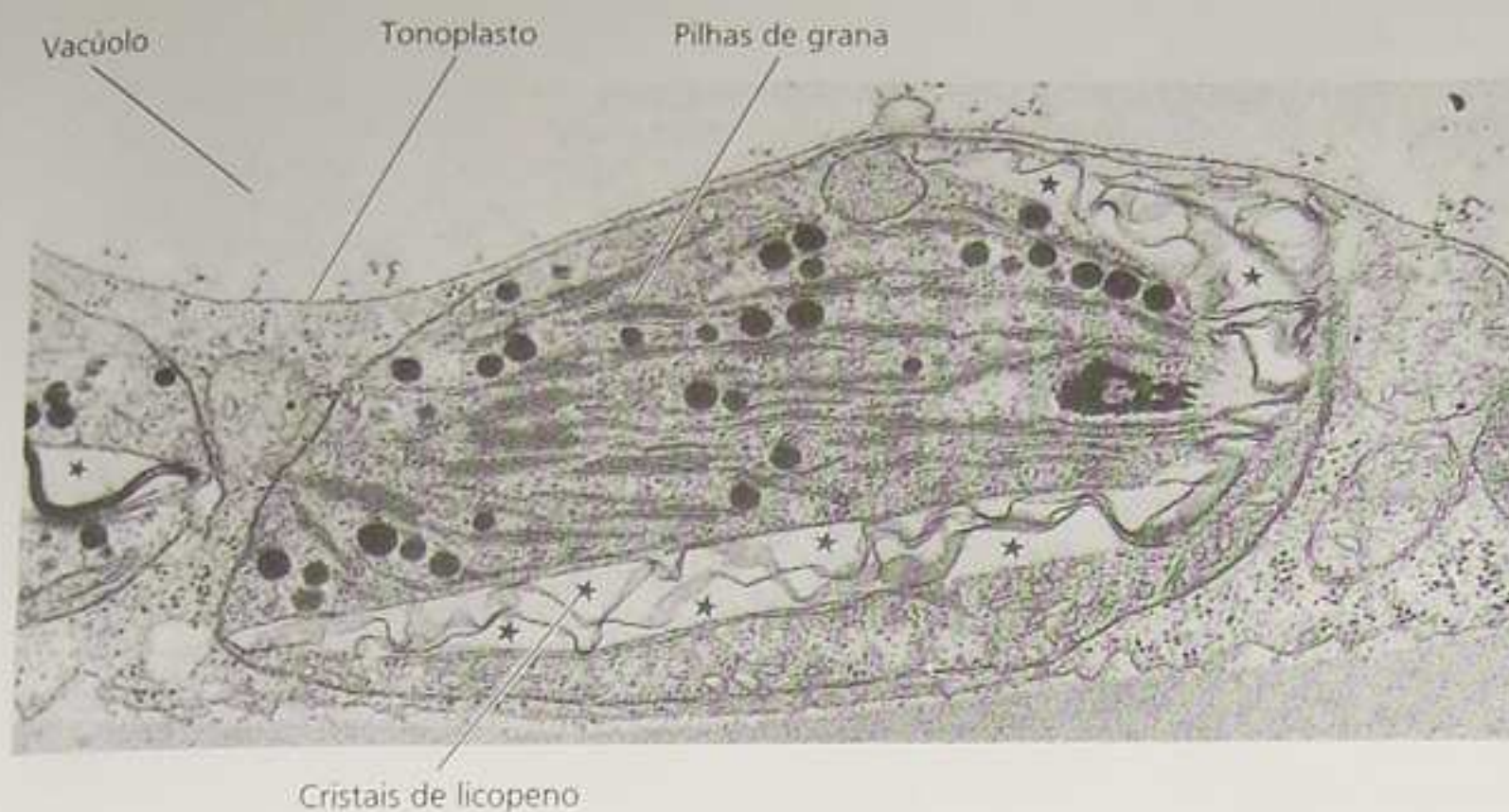



FIGURA 1.17 Electromicrografia de um cromoplasto do fruto de um tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) no estádio inicial de transição entre um cloroplasto e um cromoplasto. Pequenas pilhas de *grana* ainda podem ser observadas. Os cristais do carotenóide licopeno estão indicados por estrelas (27.000×) (Gunning e Steer, 1996).

do estroma dos plastídeos, denominadas **nucleóides**. A replicação do DNA das mitocôndrias e dos cloroplastos é independente da replicação do DNA nuclear. Por outro lado, a quantidade dessas organelas em um determinado tipo celular permanece aproximadamente constante, sugerindo que alguns aspectos da replicação da organela estão sob regulação celular.

O genoma das mitocôndrias dos vegetais consiste de cerca de 200 mil pares de bases, um tamanho consideravelmente maior do que o genoma da maioria das mitocôndrias das células animais. As mitocôndrias das células meristemáticas são tipicamente poliplóides, ou seja, elas contêm múltiplas cópias do cromossomo circular. No entanto, o número de cópias por mitocôndria diminui gradualmente com a maturação celular, pois as mitocôndrias continuam a se dividir sem haver a síntese de DNA.

As proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial, em sua maioria, são proteínas ribossômicas 70S similares às dos procariontes e componentes do sistema de transporte de elétrons. Grande parte das proteínas mitocondriais, incluindo as enzimas do ciclo de Krebs, é codificada por genes nucleares e importada do citosol.

O genoma do cloroplasto é menor que o genoma mitocondrial, apresentando cerca de 145 mil 145.000 pares de bases. Enquanto as mitocôndrias são poliplóides apenas no meristema, os cloroplastos tornam-se poliplóides durante a maturação celular. Assim, a quantidade média de DNA por cloroplasto na planta é superior a da mitocôndria. A quantidade total de DNA das mitocôndrias e dos plastídeos combinados é aproximadamente um terço do genoma nuclear (Gunning e Steer 1996).

O DNA do cloroplasto codifica rRNA, tRNA, a subunidade maior da enzima que fixa CO_2, a ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) e várias proteínas que participam da fotossíntese. Apesar disso, a maioria das proteínas dos cloroplastos, como nas mitocôndrias, é codificada por genes nucleares, sintetizada no citoplasma e transportada para a organela. Embora as mitocôndrias e os cloroplastos possuam seus próprios genomas e possam se dividir independentemente da célula, são caracterizados como *organelas semi-autônomas*, pois dependem do núcleo para a grande parte das suas proteínas.

Diferentes tipos de plastídeos são passíveis de interconversão

As células meristemáticas contêm **proplastídeos**, os quais não possuem clorofila, apresentam poucas ou nenhuma membrana interna e um conjunto incompleto de enzimas necessárias para realizar a fotossíntese (Figura 1.18A). Nas angiospermas e algumas gimnospermas, o desenvolvimento do cloroplasto a partir do proplastídeo é desencadeado pela luz. Sob iluminação, as enzimas são formadas no proplastídeo ou importadas do citosol, os pigmentos para a captação da luz são sintetizados e as membranas desenvolvem-se rapidamente, originando as lamelas do estroma e as pilhas de *grana* (Figura 1.18B).

As sementes normalmente germinam no solo em ausência de luz, enquanto os cloroplastos desenvolvem-se somente quando a parte aérea jovem é exposta à luz. Se as sementes são germinadas no escuro, os proplastídeos se diferenciam em **estioplastos**, os quais apresentam arranjos semicristalinos tubulares de membranas, conhecidos como **corpos pró-lamelares** (Figura 1.18C). Em vez da clorofila, os estioplastos contêm um pigmento precursor, de cor verde-amarelada, o **protoclorofilida.**

Minutos após a exposição à luz, o estioplasto se diferencia, convertendo o corpo pró-lamelar em tilacóides e membranas lamelares e a protoclorofilida em clorofila. A manutenção da estrutura do cloroplasto depende da presença de luz e os cloroplastos maduros podem ser revertidos a estioplastos durante longos períodos de escuro.

É possível os cloroplastos converterem-se em cromoplastos, como no caso das folhas no outono e do amadurecimento dos frutos, e, em alguns casos, este processo é reversível. Os amiloplastos, por sua vez, podem ser convertidos em cloroplastos, o que explica por que a exposição das raízes à luz resulta, com freqüência, na coloração esverdeada adquirida por esse órgão.

(A)

(B)

(C)

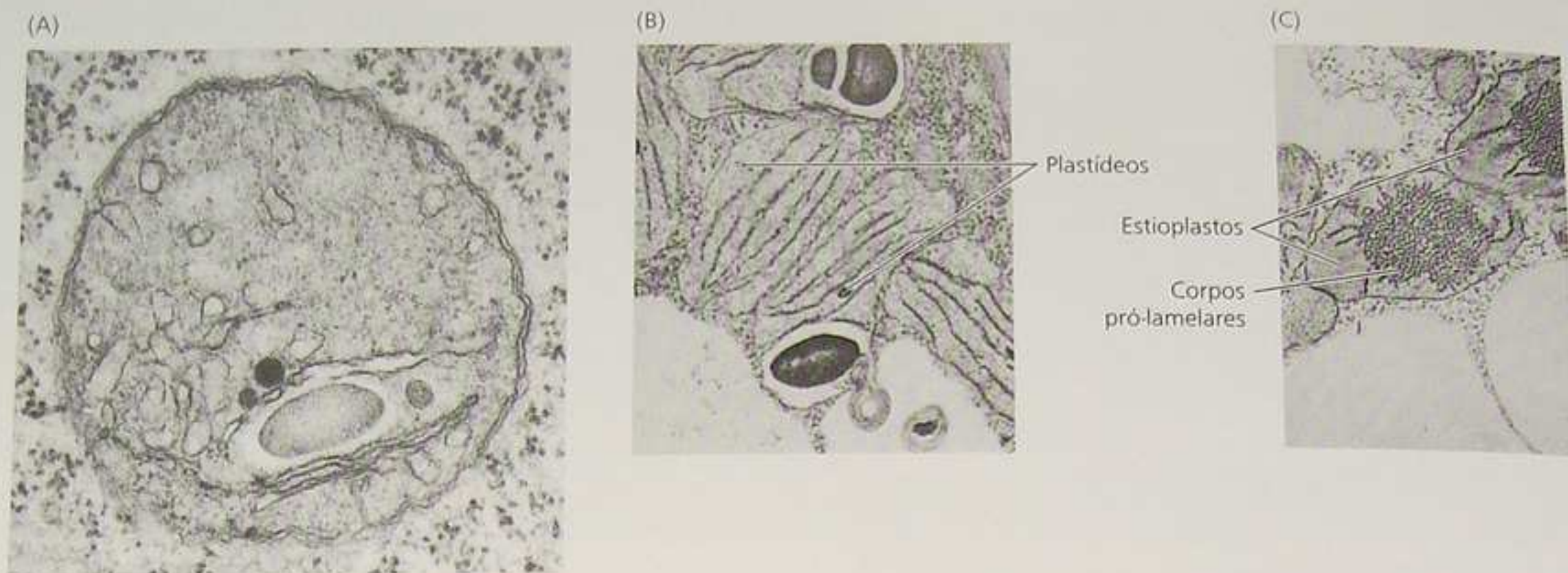
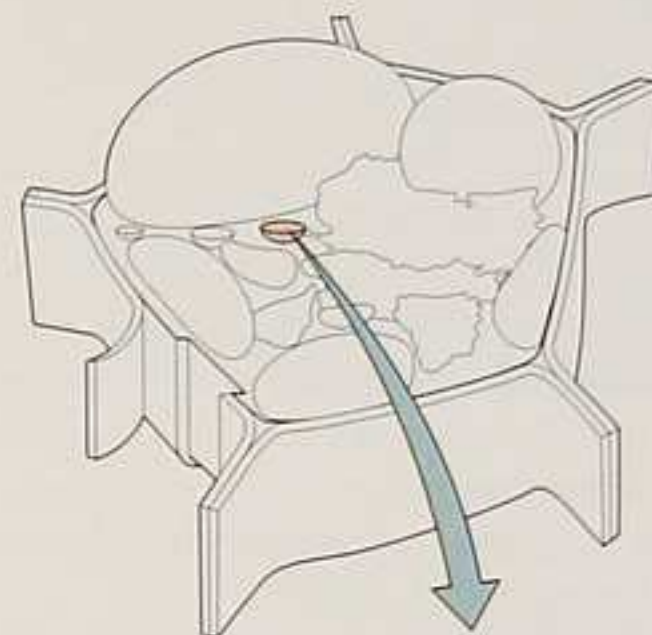
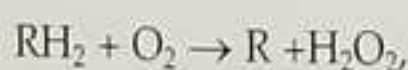
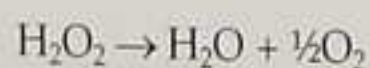



FIGURA 1.18 Electromicrografias ilustrando vários estádios do desenvolvimento de plastídeos. (A) Vista, em grande aumento, de um proplastídeo do meristema apical da raiz de fava (*Vicia faba*). O sistema de membrana interna é rudimentar e os *grana* não estão presentes (47.000×). (B) Uma célula de mesofilo de uma folha jovem de aveia em um estádio inicial de diferenciação na luz. Os plastídeos estão se desenvolvendo em vários *grana*. (C) Célula de uma folha jovem de uma plântula de aveia crescida no escuro. Os plastídeos desenvolveram-se como amiloplastos, com túbulos de membranas semicristalinas entrelaçadas, chamados de corpos pró-lamelares. Quando expostos à luz, os estioplastos podem se converter em cloroplastos pela desorganização dos corpos pró-lamelares e formação de vários *grana* (7.200×) (Gunning e Steer, 1996).

Os microcorpos desempenham funções metabólicas especializadas nas folhas e nas sementes

As células vegetais também apresentam microcorpos, uma classe de organelas esféricas envoltas por uma única membrana e especializadas para uma de várias funções metabólicas. Os dois tipos principais de microcorpos são os peroxissomos e os glioxissomos.

Os **peroxissomos** são encontrados em todos os organismos eucariontes, estando presentes nas células fotossintéticas dos vegetais (Figura 1.19). Os peroxissomos têm função na remoção de hidrogênios de substratos orgânicos, consumindo O_2 no processo, de acordo com a seguinte reação:

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2,$$

onde R é o substrato orgânico. O peróxido, potencialmente prejudicial, produzido nessas reações é degradado nos peroxissomos pela enzima catalase, conforme mostra a reação a seguir:

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \tfrac{1}{2}O_2$$

Embora algum oxigênio seja regenerado durante a reação da catalase, há um consumo líquido de todo o oxigênio.

Outro tipo de microcorpo, o **glioxissomo,** está presente nas sementes que armazenam óleos. Os glioxissomos contêm as enzimas do *ciclo do glioxilato* que auxiliam na conversão dos ácidos graxos armazenados em açúcares, os quais podem ser translocados

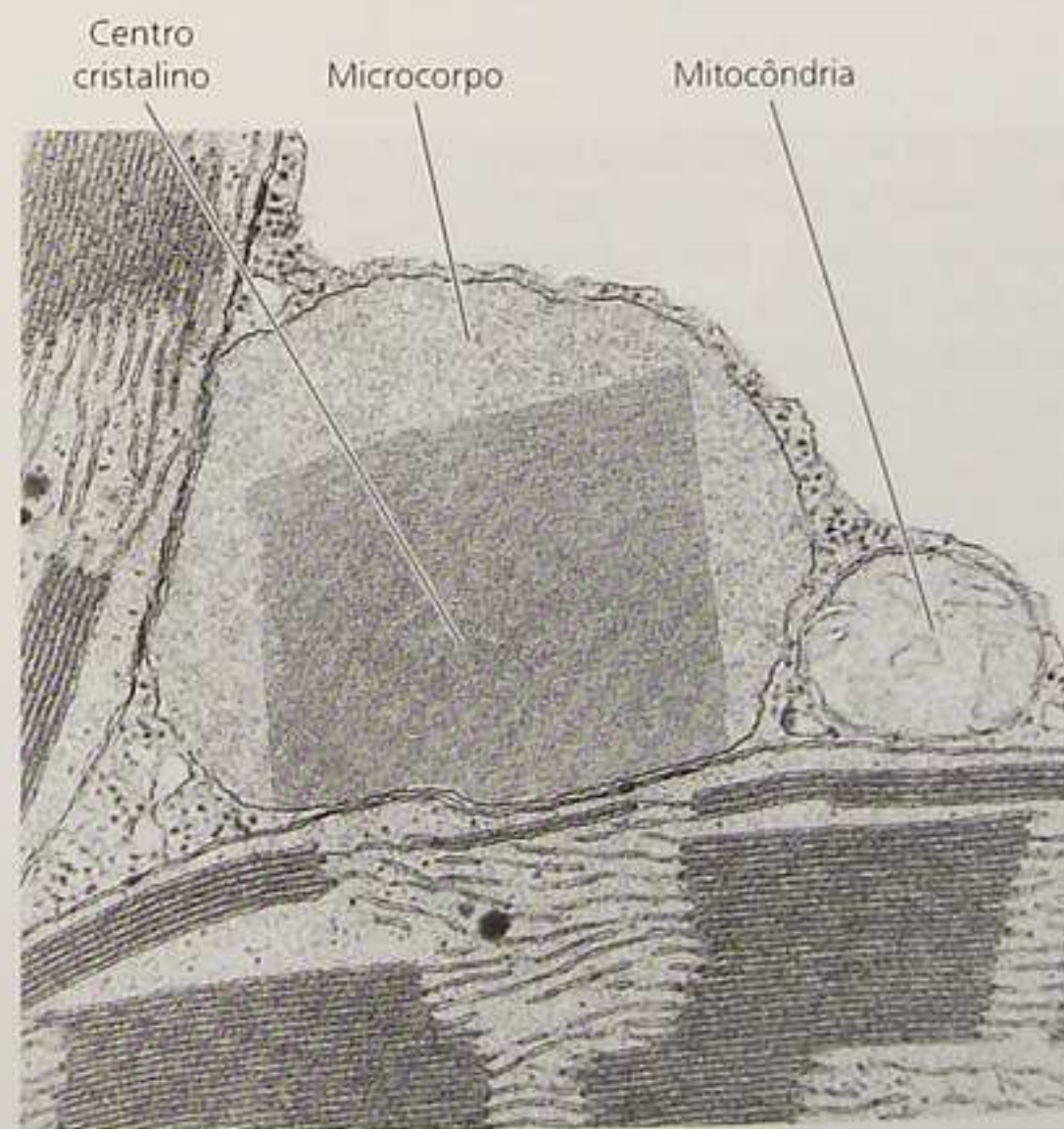



FIGURA 1.19 Electromicrografia de um peroxissomo de uma célula do mesofilo, mostrando um centro cristalino (27.000×). Este peroxissomo é observado em associação com dois cloroplastos e uma mitocôndria, provavelmente refletindo a interação dessas três organelas durante a fotorrespiração (Huang, 1987).

pela planta jovem para produzir energia para o crescimento (ver Capítulo 11). Visto que ambos os tipos de microcorpos realizam reações oxidativas, tem sido sugerido que eles possam ter evoluído a partir de organelas respiratórias primitivas que foram substituídas pelas mitocôndrias.

Os oleossomos são organelas de reserva de lipídeos

Além do amido e das proteínas, muitas plantas sintetizam grandes quantidades de triacilglicerol na forma de óleo, durante o desenvolvimento da semente. Esses óleos acumulam-se em organelas denominadas **oleossomos**, também conhecidas como *corpos lipídicos* ou *esferossomos* (ver Figura 1.20 A).

Os oleossomos são os únicos entre as organelas que são envolvidos por uma "meia unidade de membrana" — ou seja, uma monocamada fosfolipídica — derivada do RE (Hardwood, 1997). Os fosfolipídeos dessa membrana são orientados com seus grupos da cabeça polar em direção à fase aquosa e suas caudas apolares de ácidos graxos voltadas para o lume, dissolvidas no lipídeo armazenado. Parece que os oleossomos originam-se do depósito dos lipídeos na bicamada (ver Figura 1.20 B).

As proteínas **oleosinas** estão presentes na meia unidade de membrana (Figura 1.20 B). Uma das funções das oleosinas parece ser a manutenção de cada oleossomo como uma organela distinta, evitando a sua fusão. As oleosinas podem também auxiliar a ligação de outras proteínas à superfície da organela. Conforme já mencionado, os lipídeos dos oleossomos são degradados durante a germinação da semente e convertidos em sacarose com o auxílio do glioxissomo. A primeira etapa do processo é a hidrólise das cadeias de ácidos graxos a partir do esqueleto de glicerol pela enzima lipase. A lipase está fortemente associada à superfície da meia unidade de membrana e pode estar ligada às oleosinas.

CITOESQUELETO

O citosol está organizado em uma rede tridimensional de proteínas filamentosas, o **citoesqueleto**. Essa rede proporciona uma organização espacial para as organelas e serve como um arcabouço para os movimentos das organelas e de outros componentes do citoesqueleto. Também apresenta um papel fundamental nos processos de mitose, meiose, citocinese, depósito da parede, manutenção da forma celular e diferenciação celular.

As células vegetais contêm microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários

Três tipos de elementos do citoesqueleto foram identificados nas células vegetais: microtúbulos, microfilamentos e estruturas semelhantes aos filamentos intermediários. Cada tipo é filamentoso, apresentando diâmetro fixo e comprimento variável, podendo atingir muitos micrômetros.

Os microtúbulos e os microfilamentos são conjuntos macromoleculares de proteínas globulares. Os **microtúbulos** são cilindros ocos com diâmetro externo de 25 nm; são compostos de polímeros da proteína **tubulina**. O monômero de tubulina dos

(A)

Oleossomo

Peroxissomo

(B)

Retículo endoplasmático liso

Óleo

Corpo oleoso

Oleosina

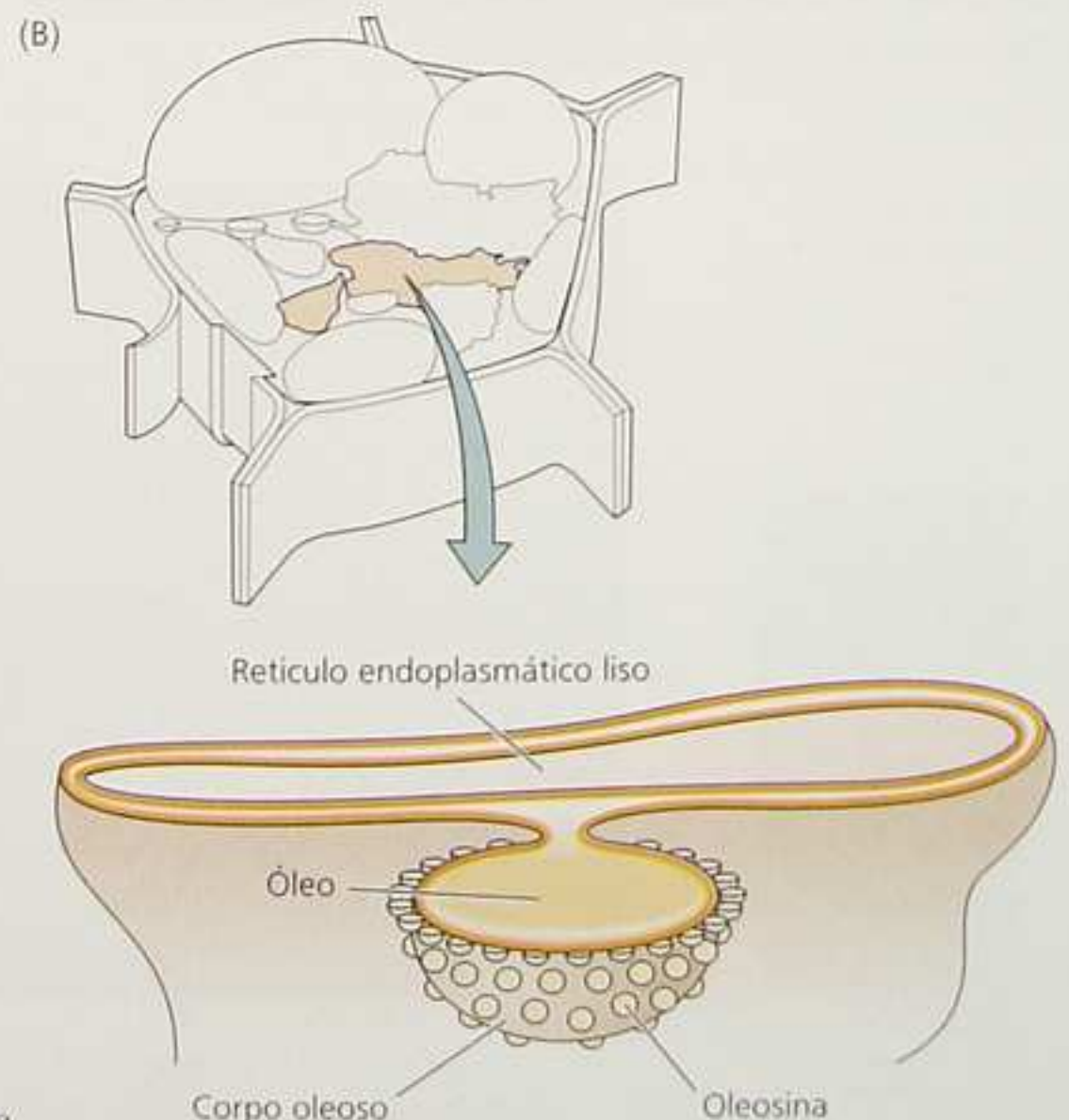
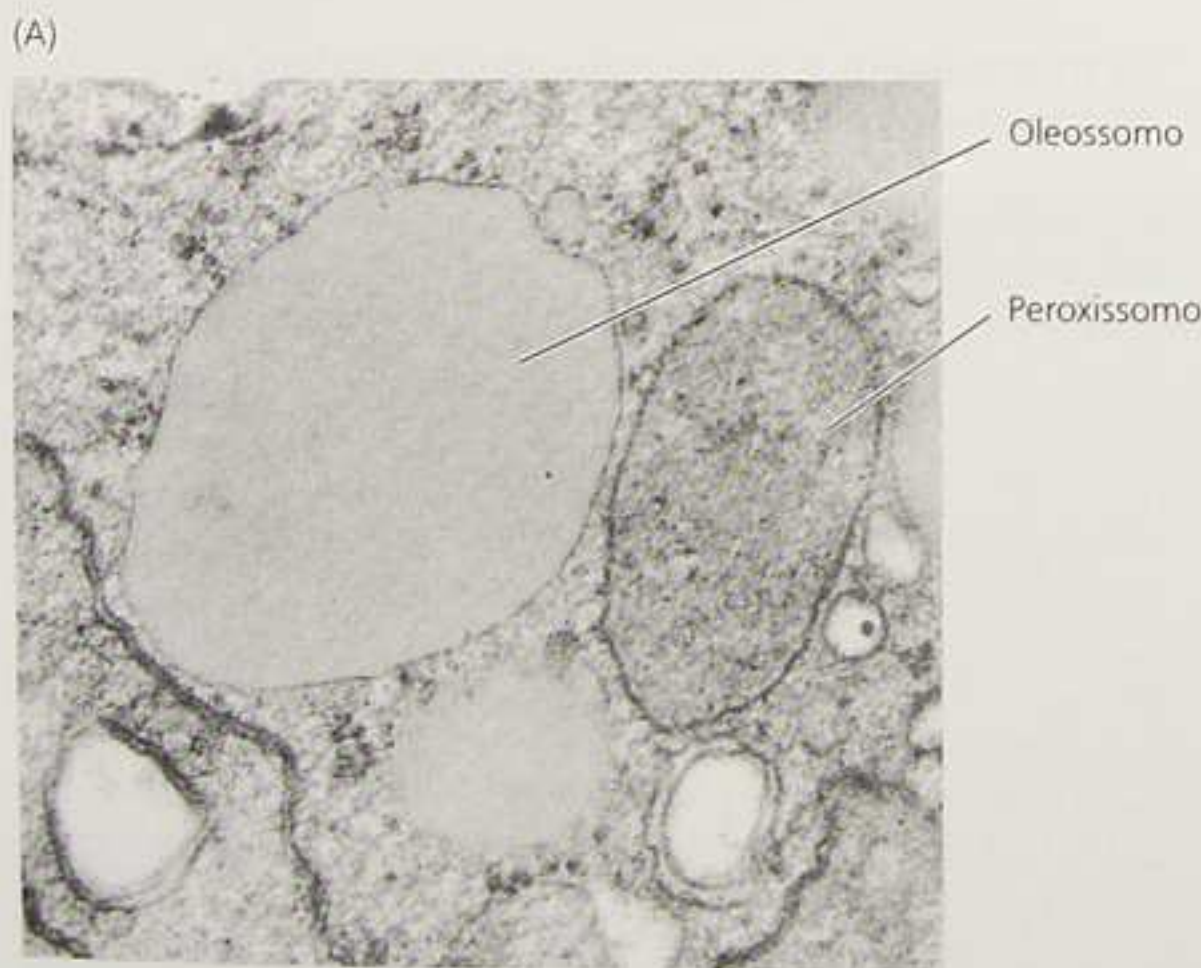



FIGURA 1.20 (A) Electromicrografia de um oleossomo ao lado de um peroxissomo. (B) Diagrama ilustrando a formação de oleossomos pela síntese e pelo depósito de óleo na bicamada fosfolipídica do RE. Após o brotamento do RE, o oleossomo é envolto por uma monocamada de fosfolipídeos contendo a proteína oleosina (A, de Huang 1987; B, segundo Buchanan e cols., 2000).

microtúbulos é um heterodímero composto por duas cadeias polipeptídicas similares (α e β-tubulina), cada uma com massa molecular de 55.000 dáltons (Figura 1.21A). Um único microtúbulo consiste de centenas de milhares de monômeros de tubulina organizados em 13 colunas, os *protofilamentos*.

Os **microfilamentos** são sólidos, com diâmetro de 7 nm, compostos de uma forma especial de proteína encontrada no músculo: a actina globular ou **actina-G**. Cada molécula de actina possui um único polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 42.000 dáltons. Um microfilamento consiste de duas cadeias de subunidades de actina polimerizadas, que se entrelaçam de forma helicoidal (Figura 1.21B).

Os **filamentos intermediários** constituem um grupo diverso de elementos fibrosos helicoidais de 10 nm de diâmetro, compostos de monômeros polipeptídicos lineares de vários tipos. Nas células animais, por exemplo, as **laminas nucleares** são compostas de monômeros polipeptídicos específicos, enquanto as **queratinas**, um tipo de filamento intermediário encontrado no citoplasma, são formadas de um monômero polipeptídico diferente.

Nos filamentos intermediários animais, pares de monômeros paralelos (i. é, com seus grupos $-NH_2$ alinhados na mesma extremidade) são torcidos sobre si mesmos, de forma helicoidal, como um **dímero torcido.** Dois dímeros alinham-se de forma antiparalela (i. é, com seus grupos — NH_2 em extremidades opostas, formando um tetrâmero). Esses tetrâmeros, então, ligam-se uns aos outros, formando o filamento intermediário final (Figura 1.22).

Embora as laminas nucleares pareçam estar presentes nas células vegetais, ainda não há evidências para a existência de filamentos intermediários de queratina no citosol. Como já mencionado, as proteínas integrais ligam transversalmente a membrana à parede celular rígida. Tais conexões com a parede estabilizam o protoplasto e auxiliam a manter a forma celular. Assim, a parede celular serve como um tipo de exoesqueleto celular, talvez evitando a necessidade de filamentos intermediários do tipo queratina para a sustentação estrutural.

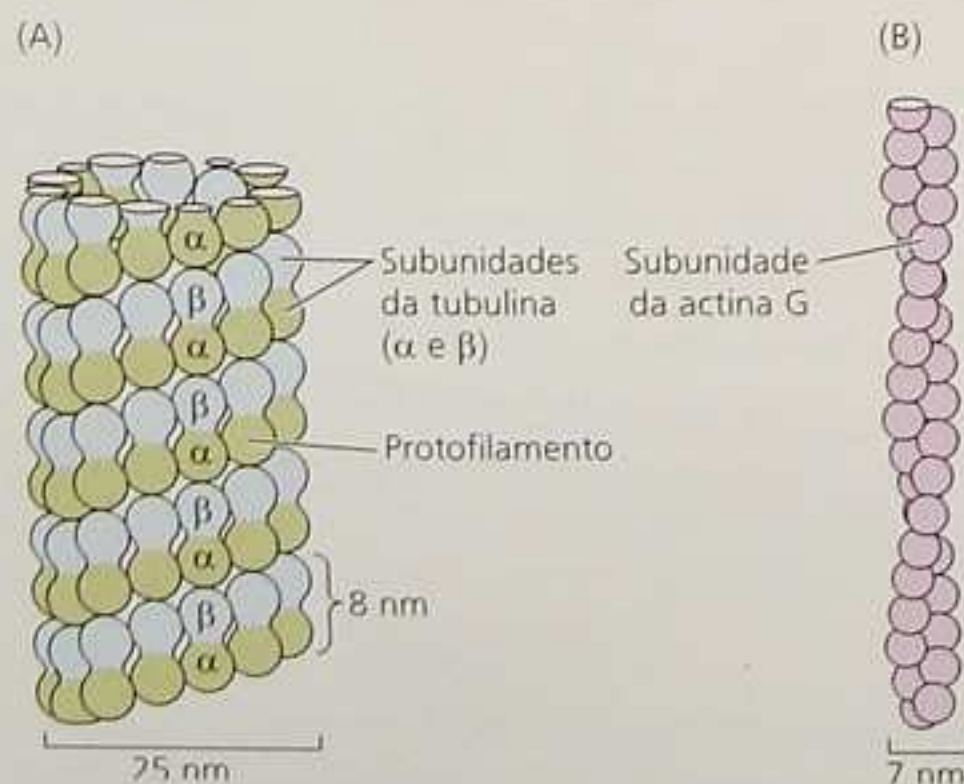



FIGURA 1.21 (A) Desenho de um microtúbulo em vista longitudinal. Cada microtúbulo é composto de 13 protofilamentos. A organização das subunidades α e β é ilustrada. (B) Diagrama de um microfilamento, mostrando os dois filamentos de subunidades da actina G.

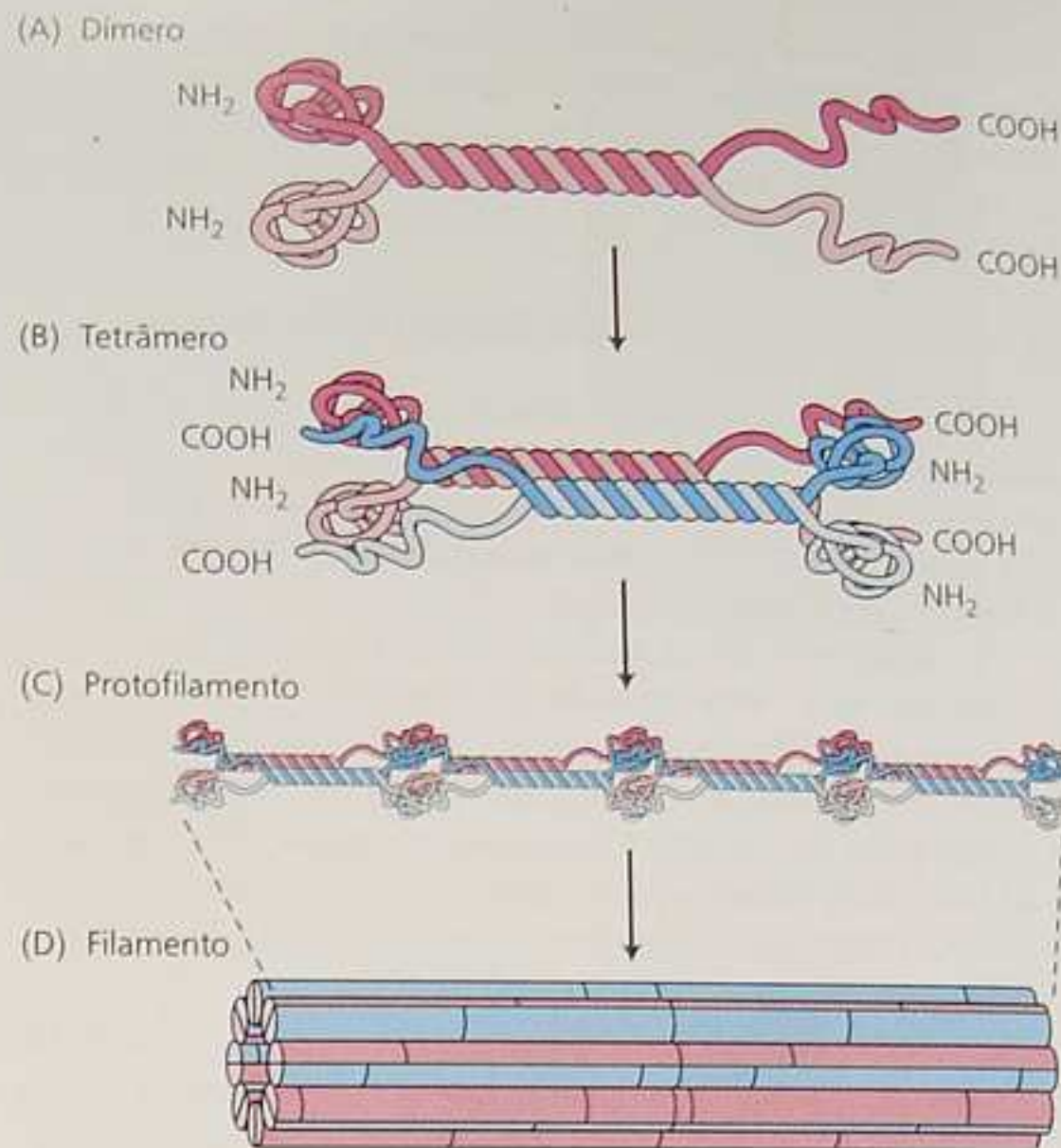



FIGURA 1.22 Modelo atual de formação de filamentos intermediários a partir de monômeros protéicos. (A) Dímero torcido em orientação paralela (i. é, com porções amino e carboxiterminal nas mesmas extremidades). (B) Um tetrâmero de dois dímeros. Observe que os dímeros estão organizados de modo antiparalelo e que um é levemente deslocado em relação ao outro. (C) Dois tetrâmeros. (D) Tetrâmeros ligados, formando um filamento intermediário de 10 nm (Alberts e cols., 2002).

Os microtúbulos e os microfilamentos podem ser polimerizados e despolimerizados

Em uma célula, os monômeros de actina e tubulina existem como *pools* de proteínas livres, que se encontram em equilíbrio dinâmico com as formas polimerizadas. A polimerização requer energia: ATP é necessário para a polimerização do microfilamento e o GTP (guanosina trifosfato) para polimerização dos microtúbulos. As ligações entre as subunidades no polímero não são covalentes, mas suficientemente fortes para manter a estrutura estável, sob condições celulares.

Tanto os microtúbulos quanto os microfilamentos são polarizados, ou seja, as duas extremidades são diferentes. Nos microtúbulos, a polaridade origina-se da polaridade do heterodímero α e β-tubulina; nos microfilamentos, a polaridade tem origem na polaridade do próprio monômero da actina. As extremidades opostas dos microtúbulos e dos microfilamentos são denominadas *mais* e *menos* e a polimerização é mais rápida na extremidade *mais*.

Uma vez formados, os microtúbulos e os microfilamentos podem ser despolimerizados. A *taxa* total de polimerização e de despolimerização dessas estruturas é afetada pelas concentrações relativas das subunidades livres ou polimerizadas. Em geral, os microtúbulos são mais instáveis do que os microfilamentos. Nas células animais, a meia-vida de um microtúbulo é de cerca de 10 minutos. Desta forma, diz-se que os microtúbulos estão em um estado de *instabilidade dinâmica*.

Ao contrário dos microtúbulos e dos microfilamentos, os filamentos intermediários não apresentam polaridade devido à orientação antiparalela dos dímeros que compõem os tetrâmeros. Além disso, os filamentos intermediários parecem ser mais estáveis que os microtúbulos ou que os microfilamentos. Embora pouco se saiba a respeito das estruturas semelhantes aos filamentos intermediários nas células vegetais, nas animais quase todas as proteínas dos filamentos intermediários ocorrem no estado polimerizado.

Os microtúbulos apresentam função na mitose e na citocinese

A **mitose** é o processo pelo qual os cromossomos previamente replicados são alinhados, separados e distribuídos ordenadamente nas células-filhas (Figura 1.23). Os microtúbulos são parte integrante da mitose. Antes do início desse processo, os microtúbulos no citoplasma cortical (mais externo) despolimerizam, disponibilizando suas subunidades. As subunidades, então, repolimerizam-se antes do início da prófase, formando a **banda pré-prófase (BPP)**, um anel de microtúbulos que circunda o núcleo (Figura 1.23 C-F). A BPP aparece na região onde a futura parede celular será formada após o término da mitose e parece estar envolvida na regulação do plano da divisão celular.

Durante a prófase, os microtúbulos iniciam sua montagem, em dois pólos nos lados opostos do núcleo, formando o **fuso da prófase** (Figura 1.24). Embora não estejam associados com qualquer estrutura específica, tais pólos têm a mesma função dos centrossomos das células animais, atuando na organização e na montagem dos microtúbulos.

No início da metáfase, o envoltório nuclear é desintegrado, a BPP despolimeriza e novos microtúbulos são polimerizados para formar o fuso mitótico. Nas células animais, os microtúbulos estendem-se uns em direção aos outros, partindo de dois pólos distintos (os centrossomos), resultando na forma elíptica do arranjo dos microtúbulos. O fuso mitótico das células vegetais, nas quais não há centrossomo, é mais semelhante à forma de uma caixa, pois os microtúbulos originam-se de uma zona difusa, consistindo de múltiplos focos nos pólos opostos da célula e se estendem em direção ao plano equatorial, em arranjos quase paralelos (Figura 1.24).

Alguns dos microtúbulos do fuso ligam-se aos cromossomos pelos **cinetócoros**, enquanto outros permanecem livres. Os cinetócoros estão localizados em regiões **centroméricas** dos cromossomos. Alguns dos microtúbulos livres sobrepõem-se aos microtúbulos da região polar oposta na zona intermediária do fuso.

A **citocinese** é o processo no qual a célula é dividida em duas células-filhas. A citocinese normalmente inicia próximo ao final da mitose. O precursor da nova parede, a **placa celular** que se forma entre as células-filhas incipientes, é rico em pectinas (Figura 1.25). A formação da placa celular nos vegetais superiores é um processo de múltiplas etapas (ver Tópico 1.5 na Internet). A agregação das vesículas na zona intermediária do fuso é organizada pelo **fragmoplasto**, um complexo de microtúbulos e RE que se forma no final da anáfase ou início da telófase, a partir das subunidades dissociadas do fuso.

Os microfilamentos estão envolvidos na corrente citoplasmática e no crescimento apical

A **corrente citoplasmática** é um movimento coordenado de partículas e organelas através do citosol em uma via helicoidal, para baixo em um lado da célula e para cima do outro lado. A corrente citoplasmática ocorre na maioria das células vegetais e tem sido estudada profundamente nas células gigantes das algas

(A) (B) (C) (D) (E) (F) (G) (H) (I) (J) (K)

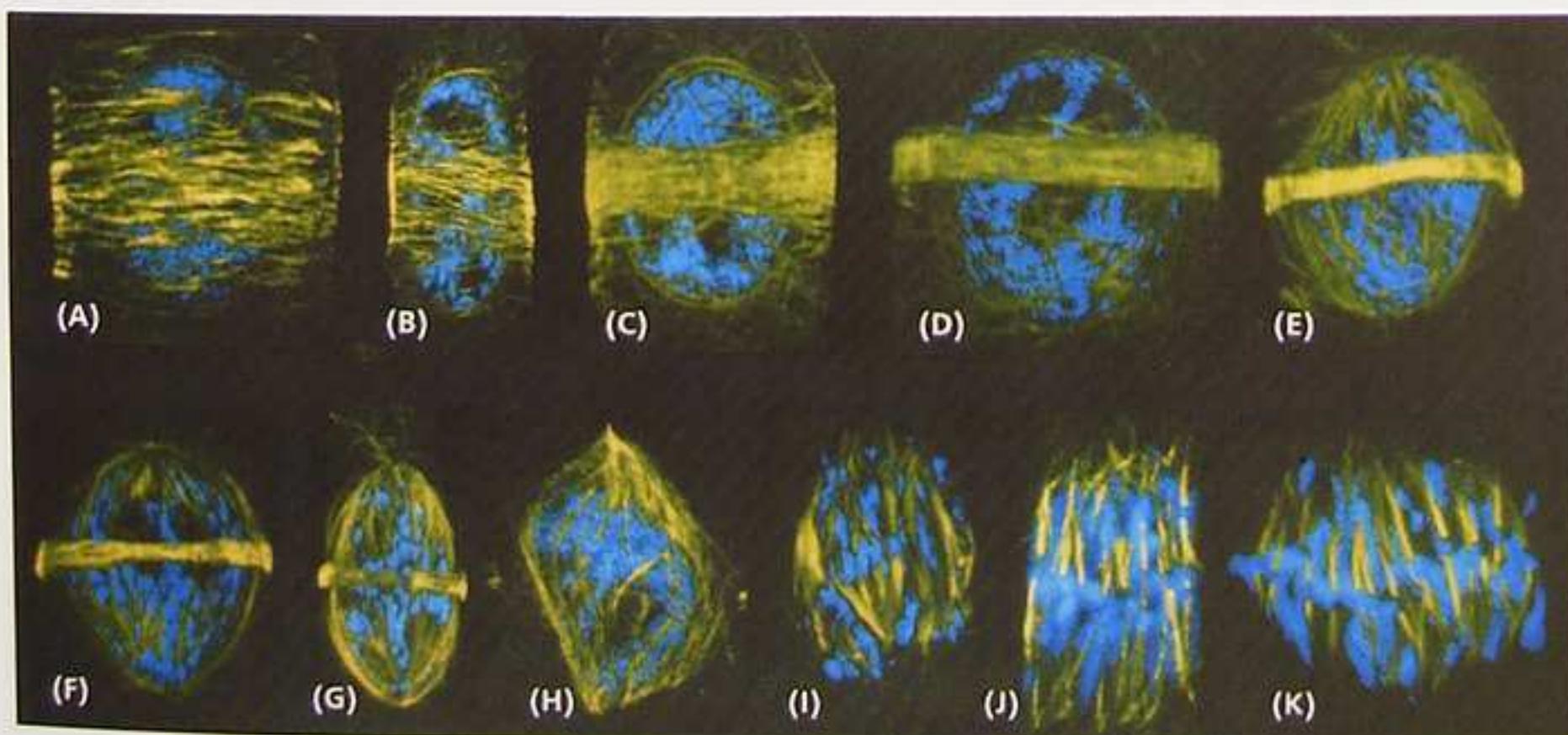



FIGURA 1.23 Micrografia de fluorescência obtida com microscópio confocal, mostrando as mudanças na organização dos microtúbulos nos diferentes estádios do ciclo celular de células de meristema de raiz de trigo. Os microtúbulos coram-se de verde e amarelo; o DNA, de azul. (A-D) Os microtúbulos corticais desaparecem e a banda pré-prófase é formada em torno do núcleo no local da futura placa celular. (E-H) O fuso da prófase forma-se a partir da região dos microtúbulos nos pólos. (I-K) O envoltório nuclear degenera-se e os dois pólos tornam-se mais difusos. O fuso mitótico forma um arranjo paralelo e os cinetócoros ligam-se aos microtúbulos do fuso (Gunning e Steer, 1996).

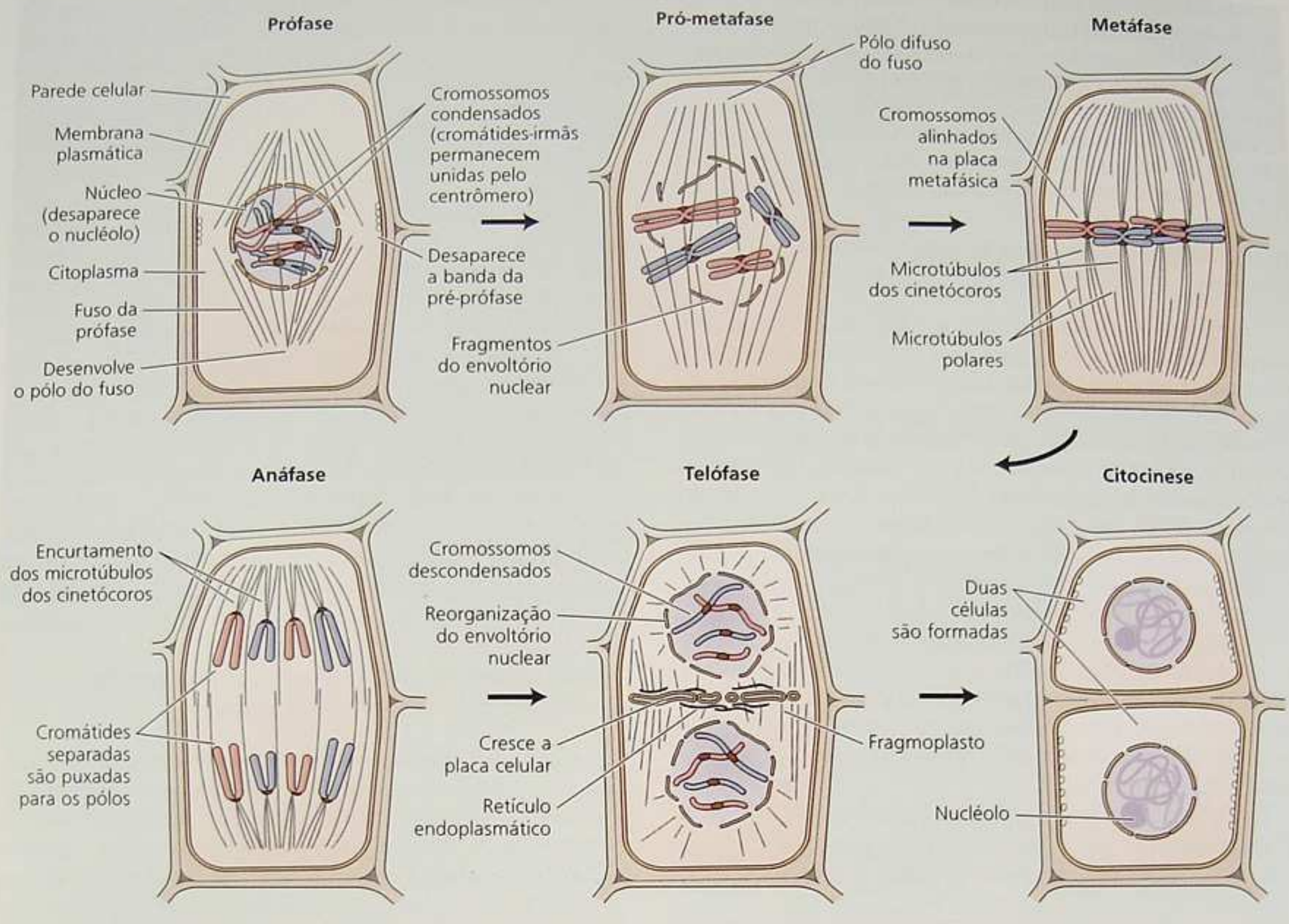



FIGURA 1.24 Diagrama da mitose em plantas.

verdes *Chara* e *Nitella*, nas quais foram medidas velocidades de até 75 μm s^{-1}.

O mecanismo da corrente citoplasmática envolve feixes de microfilamentos arranjados paralelamente à direção longitudinal do movimento de partículas. As forças necessárias para o movimento podem ser geradas por uma interação dos microfilamentos protéicos actina e miosina, de modo comparável à interação protéica que ocorre durante a contração muscular em animais.

As **miosinas** são proteínas que apresentam a capacidade de hidrolisar ATP a ADP e Pi, quando ativadas pela ligação a um microfilamento de actina. A energia liberada pela hidrólise do ATP faz com que a miosina mova-se ao longo do microfilamento da actina, da extremidade *menos* para a extremidade *mais*. Portanto, as miosinas pertencem à classe geral das **proteínas motoras**, que são responsáveis pela corrente citoplasmática e pelos movimentos das organelas na célula. Os exemplos de outras proteínas motoras incluem as **cinesinas** e as **dineínas**, as quais participam do movimento das organelas e outros componentes do citoesqueleto sobre a superfície dos microtúbulos.

Os microfilamentos de actina também participam no crescimento do tubo polínico. Após a germinação, o grão de pólen forma uma extensão tubular que cresce pelo estilete em direção ao saco embrionário. Como a extremidade do tubo polínico alonga-se, novo material da parede celular é continuamente depositado para manter a integridade da parede.

Uma rede de microfilamentos parece dirigir as vesículas que contêm os precursores da parede celular, a partir dos seus locais de formação no Golgi pelo citosol para o sítio de formação da nova parede na extremidade do tubo polínico. A fusão dessas vesículas com a membrana plasmática é responsável pelo depósito dos precursores da parede do lado externo da célula, onde eles são acrescentados ao material da parede.

Filamentos intermediários ocorrem no citosol e no núcleo das células vegetais

Relativamente pouco se conhece a respeito dos filamentos intermediários vegetais. Estruturas semelhantes a esses filamentos

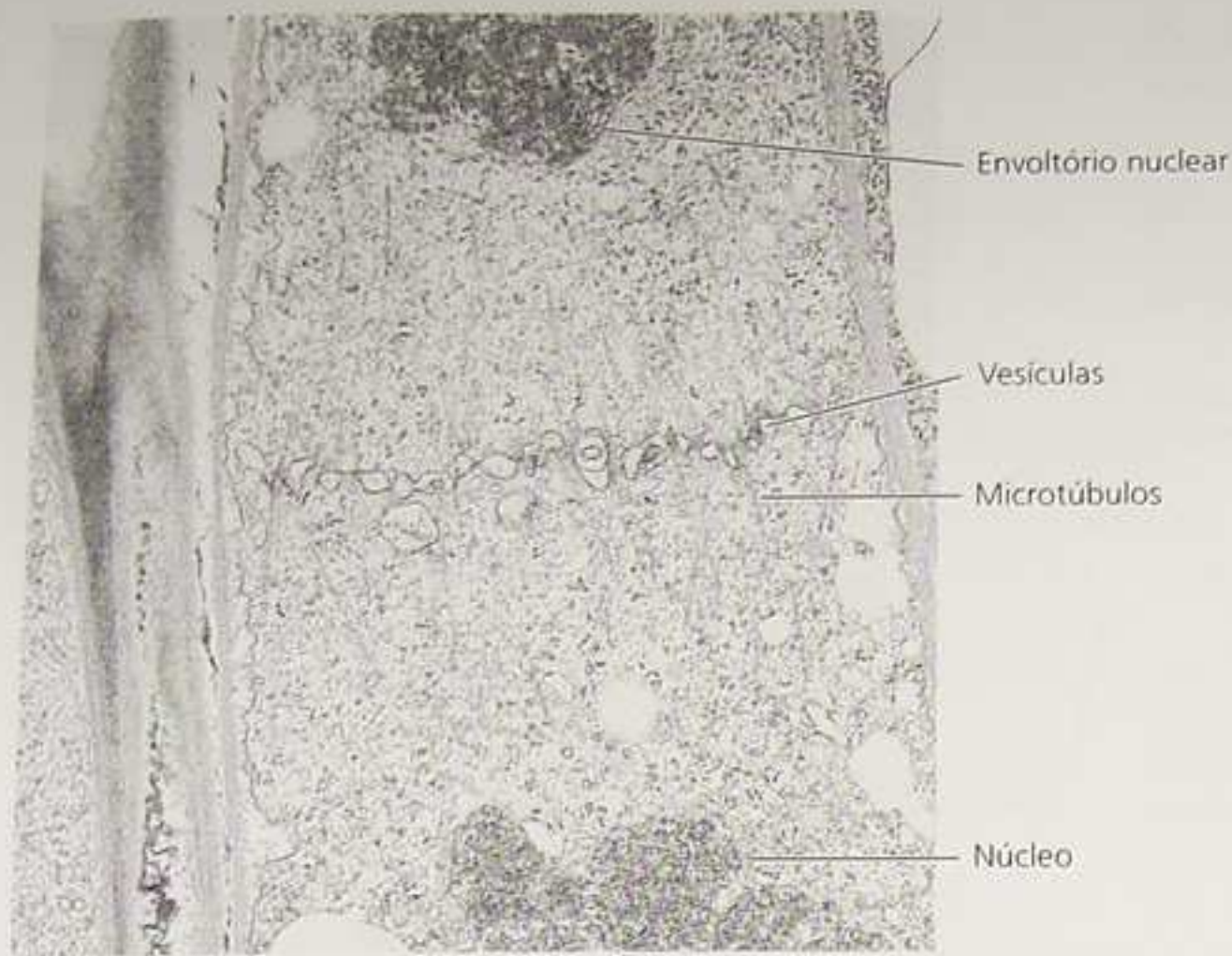



FIGURA 1.25 Electromicrografia da formação de uma placa celular em uma plântula de bordo (*Acer saccharinum*) (10.000×) (© E. H. Newcomb e B. A. Palevitz/Biological Photo Service).

foram identificadas no citoplasma de células vegetais (Yang e cols., 1995), mas podem não ser baseadas na queratina, como nas células animais, visto que até o momento nenhum gene da queratina foi identificado nos vegetais. As laminas nucleares, filamentos intermediários de outro tipo, que formam uma densa rede na superfície interna da membrana nuclear, também foram identificadas nas células vegetais (Frederick e cols., 1992) e os genes que codificam proteínas do tipo laminas estão presentes no genoma de *Arabidopsis*. Provavelmente, as laminas vegetais desempenham funções similares àquelas das células animais como um componente estrutural do envoltório nuclear.

REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

O ciclo da divisão celular, ou ciclo celular, é o processo pelo qual ocorre a reprodução da célula e do seu DNA. As quatro fases do ciclo celular são designadas G_1, S, G_2 e M (Figura 1.26A).

Cada fase do ciclo celular apresenta um conjunto específico de atividades bioquímicas e celulares

O DNA nuclear é preparado para a replicação em G_1 pela organização de um complexo pré-replicação nas origens de replicação ao longo da cromatina. O DNA é replicado durante a fase S e as células em G_2 preparam-se para a mitose.

Toda arquitetura da célula é alterada à medida que a célula entra em mitose. Ocorre a desintegração do envoltório nuclear, a condensação da cromatina para formar cromossomos distintos, a formação do fuso mitótico e a ligação dos cromossomos replicados às fibras do fuso. A passagem da metáfase para a anáfase da mitose marca o principal ponto de transição, quando as duas cromátides de cada cromossomo replicado, as quais estavam unidas nos seus cinetócoros, são separadas e os cromossomos-filhos puxados para os pólos opostos da célula pelas fibras do fuso.

Em um ponto-chave de regulação no início da fase G_1 do ciclo, as células tornam-se comprometidas com a síntese do DNA. Em leveduras, esse ponto é denominado START (em português, início). Uma vez que a célula tenha passado o START, ela está irreversivelmente comprometida a iniciar a síntese do DNA e a completar o ciclo celular por meio da mitose e da citocinese. Após a célula ter completado a mitose, ela pode iniciar um outro ciclo completo (de G_1 até a mitose) ou pode deixar o ciclo celular e se diferenciar. Tal escolha é feita no ponto crítico de G_1, antes da célula iniciar a replicação do seu DNA.

A replicação do DNA e a mitose são processos ligados nas células de mamíferos. Freqüentemente, células de mamíferos que haviam parado de se dividir são estimuladas a entrar novamente no ciclo celular por uma variedade de hormônios e fatores de crescimento. Quando são estimuladas, elas entram no ciclo celular no ponto crítico no início de G_1. Por outro lado, as células vegetais podem sair do ciclo antes ou depois de replicarem seu DNA (i. é, durante G_1 ou G_2). Como conseqüência, enquanto a maioria das células animais é diplóide (apresentam dois conjuntos de cromossomos), as vegetais são, freqüentemente, tetraplóides (quatro conjuntos de cromossomos) ou mesmo poliplóides (muitos conjuntos de cromossomos), após passarem por ciclos adicionais de replicação nuclear sem que ocorra a mitose.

O ciclo celular é regulado por proteínas quinases

O mecanismo resultante da progressão das células por meio do seu ciclo de divisão é altamente conservado na evolução, e as plantas mantiveram os componentes básicos deste mecanismo (Renaudin e cols., 1996). As enzimas-chave que controlam as transições entre os diferentes estádios do ciclo celular e a entrada das células no ciclo de divisão são as **proteínas quinases dependentes de ciclina** ou **CDKs** (do inglês, *cyclin-dependent protein kinases*) (Figura 1.26B). As proteínas quinases são enzimas que fosforilam outras proteínas utilizando o ATP. A maioria dos organismos eucariontes multicelulares utiliza em várias quinases que são ativas em diferentes fases do ciclo celular. Para suas atividades, todas dependem de subunidades reguladoras chamadas de ciclinas. A atividade regulada das CDKs é essencial para a transição de G_1 para S e de G_2 para M, bem como, ainda, para a entrada, no ciclo celular, de células que não estão em divisão.

A atividade CDK pode ser regulada de várias formas, mas os dois mecanismos mais importantes são (1) a síntese e a destruição da ciclina e (2) a fosforilação e a desfosforilação dos resíduos de aminoácidos-chave na proteína CDK. As CDKs são inativas, a menos que estejam associadas à ciclina. A maioria das ciclinas é reciclada (do inglês, *turnover*) rapidamente. Elas são sintetizadas e,

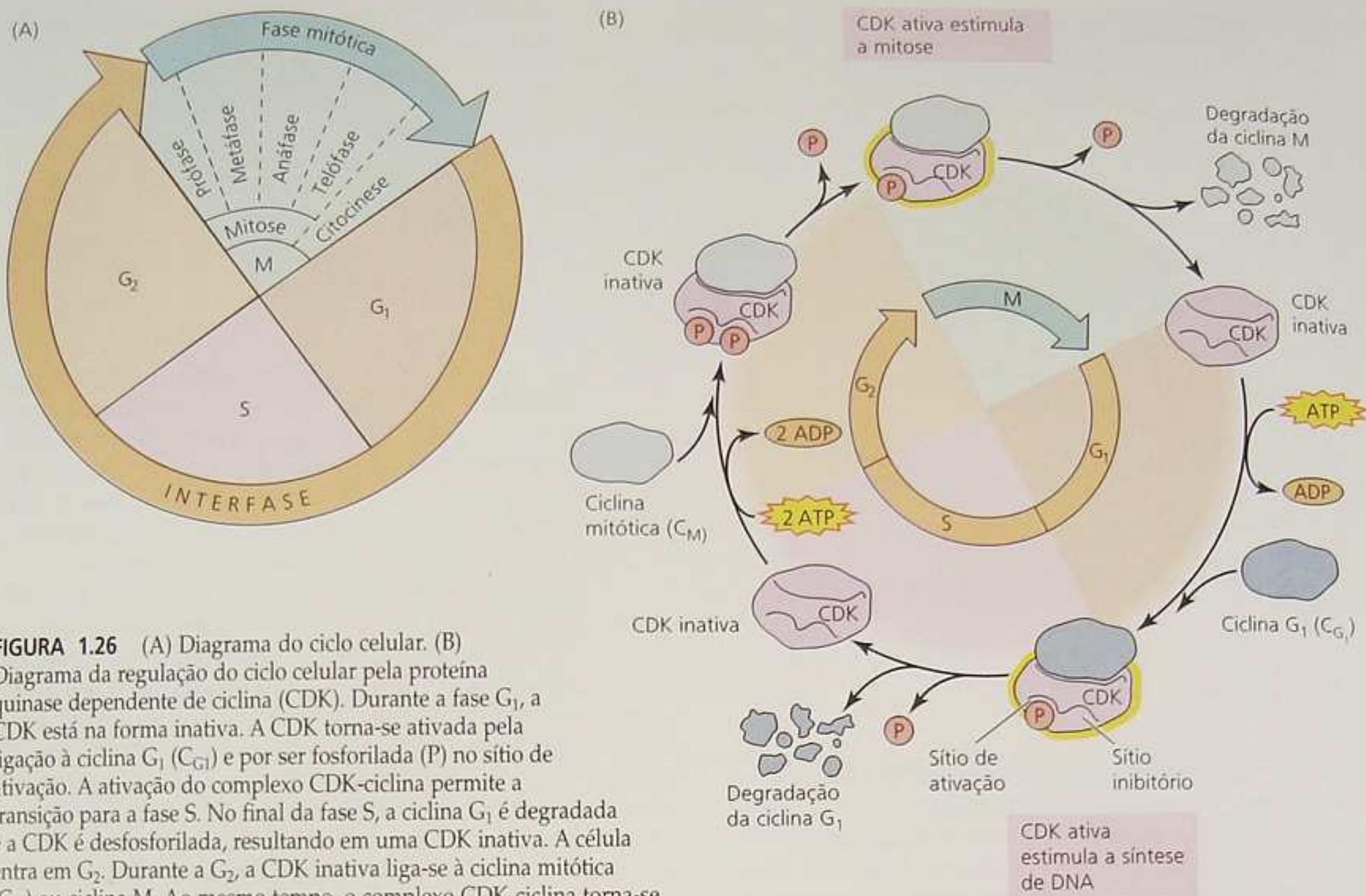



FIGURA 1.26 (A) Diagrama do ciclo celular. (B) Diagrama da regulação do ciclo celular pela proteína quinase dependente de ciclina (CDK). Durante a fase G_1, a CDK está na forma inativa. A CDK torna-se ativada pela ligação à ciclina G_1 (C_{G1}) e por ser fosforilada (P) no sítio de ativação. A ativação do complexo CDK-ciclina permite a transição para a fase S. No final da fase S, a ciclina G_1 é degradada e a CDK é desfosforilada, resultando em uma CDK inativa. A célula entra em G_2. Durante a G_2, a CDK inativa liga-se à ciclina mitótica (C_M) ou ciclina M. Ao mesmo tempo, o complexo CDK-ciclina torna-se fosforilado em ambos os sítios de ativação e de inibição. Esse complexo é ainda inativo, porque o sítio inibitório está fosforilado. O complexo inativo torna-se ativado quando o fosfato é removido do sítio inibitório por uma proteína fosfatase. A CDK ativada estimula a transição de G_2 para mitose. No final da mitose, a ciclina mitótica é degradada e o fosfato remanescente no sítio de ativação é removido por uma fosfatase; a célula entra em G_1 novamente.

então, degradadas ativamente (usando ATP) em pontos específicos do ciclo celular. As ciclinas são degradadas no citoplasma por um grande complexo proteolítico denominado **proteassomo**. Antes da degradação pelo proteassomo, as ciclinas são marcadas para a destruição pela ligação a uma pequena proteína, a *ubiquitina*, em um processo que exige ATP. A ubiquitinação consiste em um mecanismo geral de marcação de proteínas celulares destinadas à degradação (ver Capítulo 14).

A transição de G_1 para S requer um conjunto de ciclinas (conhecidas com **ciclinas G_1**) diferentes daquelas que são necessárias à transição de G_2 para mitose, na qual as **ciclinas mitóticas** ativam as CDKs (ver Figura 1.26B). As CDKs possuem dois sítios de fosforilação da tirosina: um provoca a ativação da enzima; o outro causa a inativação. Quinases específicas realizam tanto as fosforilações de ativação quanto as de inibição.

Da mesma forma, as proteínas fosfatases podem remover o fosfato das CDKs, estimulando ou inibindo sua atividade, dependendo da posição do fosfato. A adição ou a remoção dos grupos fosfatos das CDKs são processos altamente regulados e constituem um importante mecanismo para o controle da progressão do ciclo celular (Figura 1.26B). Os inibidores de ciclina exercem um papel importante na regulação do ciclo celular em animais e provavelmente também em plantas, embora pouco se conheça sobre esses inibidores de ciclina em vegetais.

Por último, como será visto mais adiante neste volume, certos hormônios vegetais são capazes de regular o ciclo celular por regular a síntese de enzimas-chave na rota de regulação.

PLASMODESMAS

Os **plasmodesmas** são extensões tubulares da membrana plasmática, de 40 a 50 nm de diâmetro, que atravessam a parede celular e conectam os citoplasmas das células adjacentes. Visto que a maioria das células vegetais é interconectada dessa maneira, os citoplasmas formam um *continuum*, referido como **simplasto**. O transporte intercelular de solutos por intermédio dos plasmodesmas é, então, chamado de **transporte simplástico** (ver Capítulos 4 e 6).

Existem dois tipos de plasmodesmas: o primário e o secundário

Os **plasmodesmas primários** formam-se durante a citocinese, quando as vesículas derivadas do Golgi, que contêm os precursores da parede celular, fusionam-se com a placa celular (a futura lamela média). Mesmo constituindo uma lâmina contínua, a placa celular é atravessada por inúmeros poros (Figura 1.27A), nos quais vestígios do aparelho do fuso, consistindo de RE e microtúbulos, interrompem a fusão das vesículas. O posterior depósito dos polímeros da parede aumenta a espessura das duas paredes celulares primárias, em ambos os lados da lamela média, gerando canais lineares revestidos de membrana (Figura 1.27B). O desenvolvimento dos plasmodesmas primários proporciona a continuidade direta e a comunicação entre as células que são relacionadas pela origem clonal (i. é, derivadas da mesma célula-mãe).

Os **plasmodesmas secundários** formam-se entre as células, após suas paredes terem sido depositadas. Eles originam-se pela evaginação da membrana na superfície da célula ou por ramificação dos plasmodesmas primários (Lucas e Wolf, 1993). Além do aumento da comunicação entre as células relacionadas pela origem clonal, os plasmodesmas secundários permitem a continuidade simplástica entre as células de origens diferentes.

Os plasmodesmas apresentam uma estrutura interna complexa

Como os poros nucleares, os plasmodesmas apresentam uma estrutura interna complexa, a qual atua na regulação do tráfego macromolecular de célula a célula. Cada plasmodesma contém um túbulo estreito de RE denominado **desmotúbulo** (ver Figura 1.27B). O desmotúbulo é contínuo com o RE das células adjacentes. Assim, o simplasto une não apenas o citoplasma das células adjacentes, mas também os conteúdos do lume do RE. Entretanto, ainda não está claro se o desmotúbulo realmente representa uma passagem, pois parece não existir um espaço entre as membranas, as quais estão firmemente comprimidas.

Proteínas globulares estão associadas à membrana do desmotúbulo e à membrana plasmática no poro (ver Figura 1.27B). Essas proteínas globulares parecem estar interconectadas por extensões radiais, dividindo o poro em oito ou dez microcanais (Ding e cols., 1992). Algumas moléculas podem passar de célula para célula através dos plasmodesmas, provavelmente fluindo pelos microcanais, embora a via exata de comunicação não tenha sido estabelecida.

Seguindo o movimento de corantes fluorescentes de diferentes tamanhos por meio dos plasmodesmas das células da epiderme foliar, Robards e Lucas (1990) determinaram que a massa

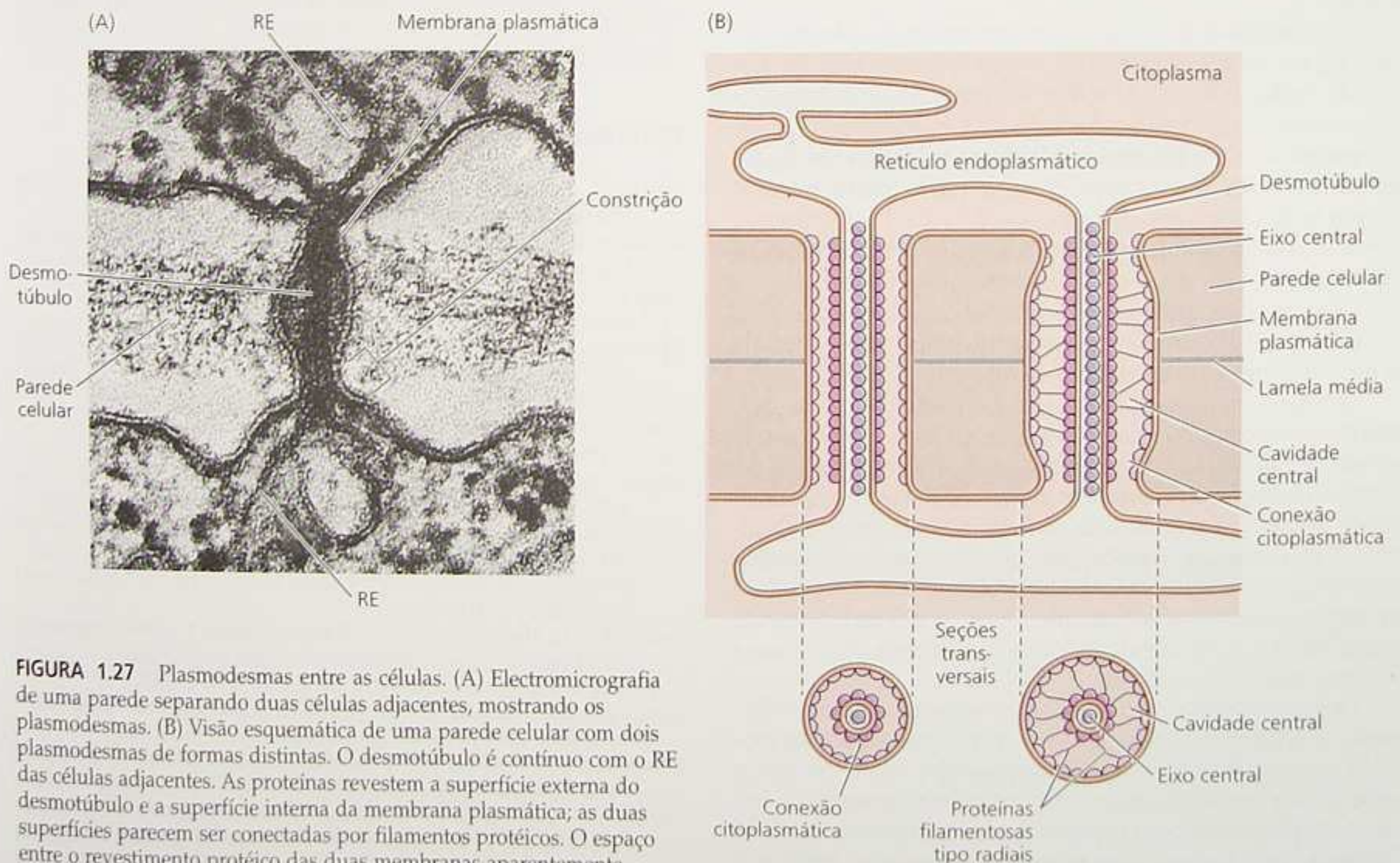



FIGURA 1.27 Plasmodesmas entre as células. (A) Electromicrografia de uma parede separando duas células adjacentes, mostrando os plasmodesmas. (B) Visão esquemática de uma parede celular com dois plasmodesmas de formas distintas. O desmotúbulo é contínuo com o RE das células adjacentes. As proteínas revestem a superfície externa do desmotúbulo e a superfície interna da membrana plasmática; as duas superfícies parecem ser conectadas por filamentos protéicos. O espaço entre o revestimento protéico das duas membranas aparentemente controla as propriedades seletivas dos plasmodesmas (A, de Tilney e cols., 1991; B, segundo Buchanan e cols., 2000).

molecular limitante para o transporte era de cerca de 700 a 1.000 dáltons, o equivalente ao tamanho molecular de cerca de 1,5 a 2 nm. Esse é o **limite de exclusão de tamanho (SEL =** *size exclusion limit*) do plasmodesma.

Se a largura de uma conexão citoplasmática é de aproximadamente 5 a 6 nm, como moléculas maiores do que 2 nm são excluídas? As proteínas ligadas à membrana plasmática e ao RE nos plasmodesmas parecem agir restringindo o tamanho de moléculas que podem passar através do poro. Como será visto no Capítulo 16, os SELs dos plasmodesmas podem ser regulados. O mecanismo para a regulação dos mesmos é pouco entendido, mas a localização da actina e da miosina no plasmodesma, formando as extensões "radiais" (ver Figura 1.27B), sugere que elas podem participar deste processo (White e cols., 1994; Radford e White, 1996). Estudos recentes também têm relacionado as proteínas quinases dependentes do cálcio à regulação do SEL dos plasmodesmas.

RESUMO

Apesar da grande diversidade em forma e tamanho, todos os vegetais realizam processos fisiológicos semelhantes. Como produtores primários, as plantas convertem a energia solar em energia química. Sendo privados de movimento, os vegetais devem crescer em direção à luz e possuir sistemas vasculares eficientes para o movimento da água, dos nutrientes minerais e dos produtos fotossintéticos por todo o corpo da planta. As plantas terrestres verdes também devem apresentar mecanismos para evitar a dessecação.

Os principais sistemas de órgãos vegetativos das plantas com sementes são a parte aérea e a raiz. A parte aérea consiste de dois tipos de órgãos: o caule e as folhas. Ao contrário do desenvolvimento animal, o crescimento dos vegetais é indeterminado, devido à presença de tecidos meristemáticos permanentes nos ápices caulinares e radiculares, os quais originam novos tecidos e órgãos durante toda a fase vegetativa do ciclo de vida. Os meristemas laterais (o câmbio vascular e o câmbio suberoso) são responsáveis pelo crescimento em diâmetro ou crescimento secundário.

Três principais sistemas de tecidos são identificados: dérmico, fundamental e vascular. Cada um deles contém uma variedade de tipos celulares especializados para diferentes funções.

Os vegetais são eucariontes e têm a organização celular tipicamente eucariótica, ou seja, apresentam núcleo e citoplasma. O genoma nuclear regula o crescimento e o desenvolvimento do organismo. O citoplasma é envolto por uma membrana plasmática e contém numerosas organelas delimitadas por membranas, incluindo os plastídeos, as mitocôndrias, os microcorpos, os oleossomos e um grande vacúolo central. Os cloroplastos e as mitocôndrias são organelas semi-autônomas, que contêm o seu próprio DNA. Apesar disso, a maioria das proteínas é codificada pelo genoma nuclear e importada do citosol.

Os componentes do citoesqueleto — microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários — participam em vários processos que envolvem movimentos intracelulares, como a mitose, a corrente citoplasmática, o transporte de vesículas secretoras, a formação da placa celular e o depósito das microfibrilas de celulose. O processo pelo qual as células se reproduzem é denominado ciclo celular. Esse ciclo consiste das fases G_1, S, G_2 e M. A transição de uma fase para outra é regulada pelas proteínas quinases dependentes de ciclina. A atividade das CDKs é regulada por ciclinas e pela fosforilação de proteínas.

Durante a citocinese, o fragmoplasto origina a placa celular em um processo de múltiplas etapas, que envolve a fusão de vesículas. Após a citocinese, a parede celular primária é depositada. O citoplasma das células adjacentes é contínuo através das paredes celulares em decorrência da presença de canais revestidos por membranas denominados plasmodesmas, os quais atuam na comunicação célula a célula.

Material da Internet

Tópicos da Internet

1.1 O reino vegetal
Análise e descrição dos principais grupos do reino vegetal.

1.2 A estrutura da flor e o ciclo de vida das angiospermas
As etapas do modo reprodutivo das angiospermas são discutidas e ilustradas.

1.3 Sistemas de tecidos vegetais: dérmico, fundamental e vascular
É fornecido um detalhamento da anatomia vegetal.

1.4 As estruturas dos glicosilglicerídeos do cloroplasto
São ilustradas as estruturas químicas dos lipídeos dos cloroplastos.

1.5 As múltiplas etapas na formação da placa celular após a mitose
Descrição dos detalhes da produção da placa celular durante a citocinese nos vegetais.

Referências bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P (2002) *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland, New York.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L. (eds.) (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD.

Ding, B., Turgeon, R., and Parthasarathy, M. V (1992) Substructure of freeze substituted plasmodesmata. *Protoplasma* 169: 28-41.

Driouich, A., Levy S., Staehelin, L. A., and Faye, L. (1994) Structural and functional organization of the Golgi apparatus in plant cells. *Plant Physiol. Biochem.* 32: 731-749.

Esau, K. (1960) *Anatomy of Seed Plants*. Wiley New York.

Esau, K. (1977) *Anatomy of Seed Plants*, 2nd ed. Wiley, New York.

Faye, L., Fitchette-Lainé, A. C., Gomord, V, Chekkafi, A., Delaunay A. M., and Driouich, A. (1992) Detection, biosynthesis and some functions of glycans N-linked to plant secreted proteins. In *Posttranslational Modifications in Plants* (SEB Seminar Series, no. 53), N. H. Battey, H. G. Dickinson, and A. M. Heatherington, eds., Cambridge University Press, Cambridge, pp. 213-242.

Frederick, S. E., Mangan, M. E., Carey J. B., and Gruber, P J. (1992) Intermediate filament antigens of 60 and 65 kDa in the nuclear matrix of plants: Their detection and localization. *Exp. Cell Res.* 199: 213-222.

Gunning, B. E. S., and Steer, M. W. (1996) *Plant Cell Biology: Structure and Function of Plant Cells*. Jones and Bartlett, Boston.

Harwood, J. L. (1997) Plant lipid metabolism. In *Plant Biochemistry*, P M. Dey and J. B. Harborne, eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 237-272.

Huang, A. H. C. (1987) Lipases in *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise*. In Vol. 9, *Lipids: Structure and Function*, P. K. Stumpf, ed. Academic Press, New York, pp. 91-119.

Lucas, W. J., and Wolf, S. (1993) Plasmodesmata: The intercellular organelles of green plants. *Trends Cell Biol.* 3: 308-315.

Capítulo da Internet*

2 Energia e enzimas

Conteúdo disponível em www.plantphys.net

O fluxo de energia é uma característica universal dos sistemas vivos, além de ser, também, a essência dos movimentos e das reações atômicas e moleculares que caracterizam os seres inanimados. As moléculas de água não poderiam mover-se no solo, penetrar na planta, ascender pelo xilema, entrar na folha e sair para a atmosfera sem que gradientes de energia direcionassem tais movimentos. A luz do sol, a parte visível do espectro eletromagnético, deve ser capturada e convertida em energia química, permitindo a síntese de moléculas orgânicas complexas necessárias à manutenção da vida. De fato, não existe um único processo físico ou químico nos vegetais que não envolva algum tipo de transformação de energia. Assim, o estudo da energia nos sistemas vivos — ou bioenergética — é fundamental para o entendimento da fisiologia vegetal.

Este capítulo revisa os conceitos básicos e os princípios da transformação de energia, denominada *termodinâmica*, bem como a sua aplicação em plantas e em outros organismos. O conceito de energia livre fornece uma estrutura para a compreensão da direção dos processos espontâneos. A presença de membranas semipermeáveis nas células vivas permite a formação de gradientes que acionam um grande número de reações necessárias à vida. Este capítulo oferece uma introdução aos conceitos de transporte de membranas, os quais são tratados mais detalhadamente nos Capítulos 3 e 4, a respeito de relações hídricas, e no Capítulo 6, sobre transporte de solutos.

Para concluir, a vida seria impossível sem a presença das *enzimas*, proteínas catalisadoras que aceleram reações, as quais ocorreriam muito lentamente para que os processos biológicos se realizassem com eficiência. Portanto, este capítulo é finalizado com uma breve visão geral da estrutura de proteínas, dos mecanismos de reações catalisadas por enzimas e as maneiras pelas quais as enzimas são reguladas nas células vivas.

FLUXO DE ENERGIA NOS SISTEMAS VIVOS

ENERGIA E TRABALHO

Primeira lei: a energia total é sempre conservada

A mudança na energia interna de um sistema representa o máximo de trabalho que ele pode executar

Cada tipo de energia é caracterizado por um fator capacidade e por um fator potencial

A DIREÇÃO DOS PROCESSOS ESPONTÂNEOS

Segunda lei: A entropia total sempre aumenta

Um processo é espontâneo se ΔS for positivo para o sistema e seu meio externo

ENERGIA LIVRE E POTENCIAL QUÍMICO

ΔG é negativo para processos espontâneos em temperatura e pressão constantes

A mudança-padrão na energia livre, $\Delta G°$, é a mudança na energia livre quando a concentração dos reagentes e dos produtos é 1 M

O valor de ΔG é uma função do deslocamento da reação a partir do equilíbrio

A mudança na entalpia mede a energia transferida como calor

REAÇÕES REDOX

A mudança na energia livre de uma reação de oxidação-redução é expressa como Potencial Redox Padrão em unidades eletroquímicas

(Continua)

*O texto em língua portuguesa está disponível em www.artmed.com.br, em Material de Apoio.

PARTE

I

Transporte e translocação de água e solutos

Capítulo

3 A água e as células vegetais

A ÁGUA DESEMPENHA UM PAPEL FUNDAMENTAL na vida da planta. Para cada grama de matéria orgânica produzida pela planta, aproximadamente 500 g de água são absorvidos pelas raízes, transportados através do corpo da planta e perdidos para a atmosfera. Mesmo um pequeno desequilíbrio nesse fluxo de água pode causar déficits hídricos e mau funcionamento severo de inúmeros processos celulares. Assim, toda planta deve realizar um balanço delicado de sua absorção e perda de água, o qual se constitui em um sério desafio para as plantas terrestres. Para fotossintetizar, elas precisam retirar dióxido de carbono da atmosfera, mas, ao fazê-lo, expõem-se à perda de água e à ameaça de desidratação.

A principal diferença entre células animais e vegetais, que afeta virtualmente todos os aspectos de suas relações com a água, é a presença da parede celular nas plantas, que lhes permite desenvolver grandes pressões hidrostáticas internas, chamadas de pressões de turgor, resultantes do processo normal de balanço hídrico. A pressão de turgor é essencial para muitos processos fisiológicos, incluindo expansão celular, trocas gasosas nas folhas, transporte no floema e vários processos de transporte pelas membranas. A pressão de turgor também contribui para a rigidez e a estabilidade mecânica de tecidos vegetais não-lignificados. Neste capítulo, será considerada a maneira como a água movimenta-se para dentro e para fora das células vegetais, enfatizando as propriedades moleculares da água e as forças físicas que influenciam o seu movimento em nível celular. Porém, primeiro serão descritas as principais funções da água na vida vegetal.

A ÁGUA NA VIDA DAS PLANTAS

A água compreende a maioria da massa de células vegetais, o que pode de imediato ser constatado se forem visualizadas ao microscópio seções de células vegetais maduras: cada célula contém um grande vacúolo cheio de água. Nessas células, o citoplasma compreende somente de 5 a 10% do volume celular; o restante é o vacúolo. A água tipicamente constitui de 80 a 95% da massa de tecidos vegetais em crescimento. Vegetais comuns, como cenoura e alface, por exemplo, contêm de 85 a 95% de água. A madeira, que é composta principalmente por células mortas, tem um conteúdo hídrico menor; o alburno, que atua no transporte do xilema, contém de 35 a 75% de água; o cerne, por sua

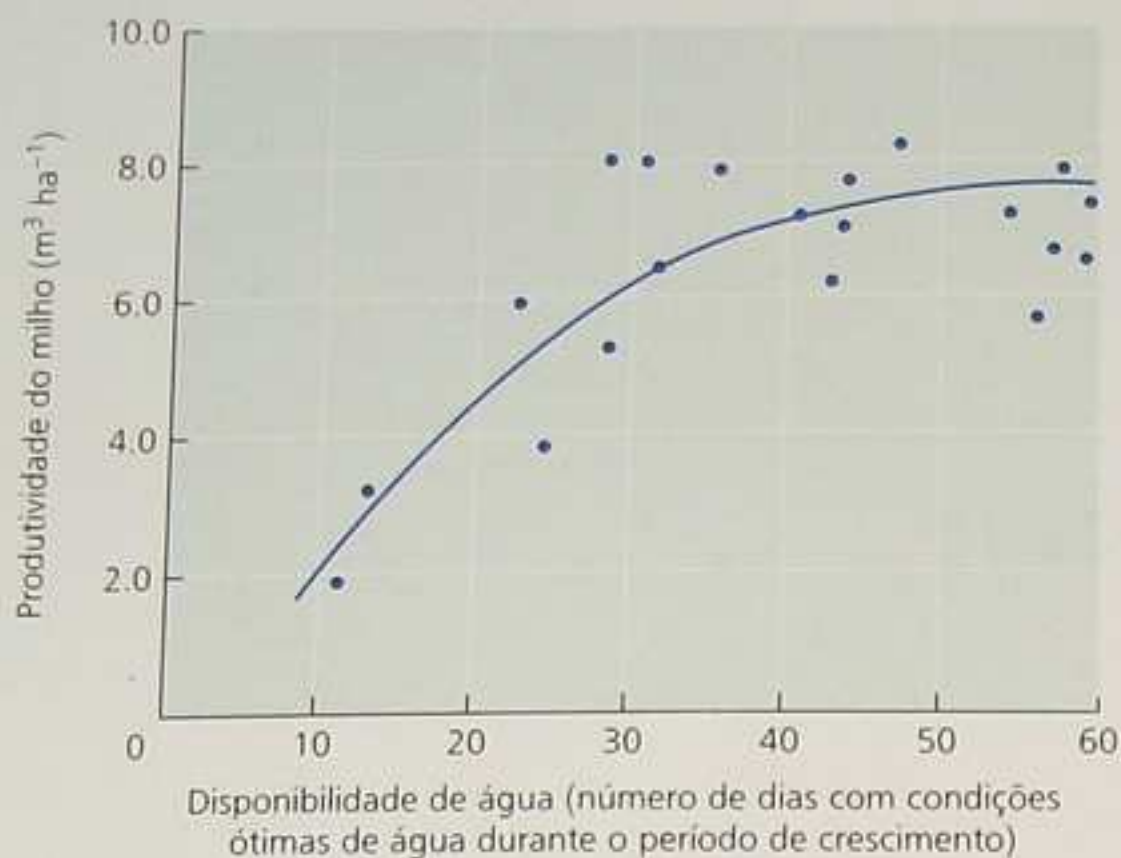



FIGURA 3.1 Produtividade do milho em função da disponibilidade de água. Os dados aqui plotados foram coletados em uma fazenda de Iowa durante quatro anos. A disponibilidade de água foi avaliada pelo número de dias sem estresse hídrico durante um período de crescimento de nove semanas (dados de *Weather and Our Food Supply*, 1964).

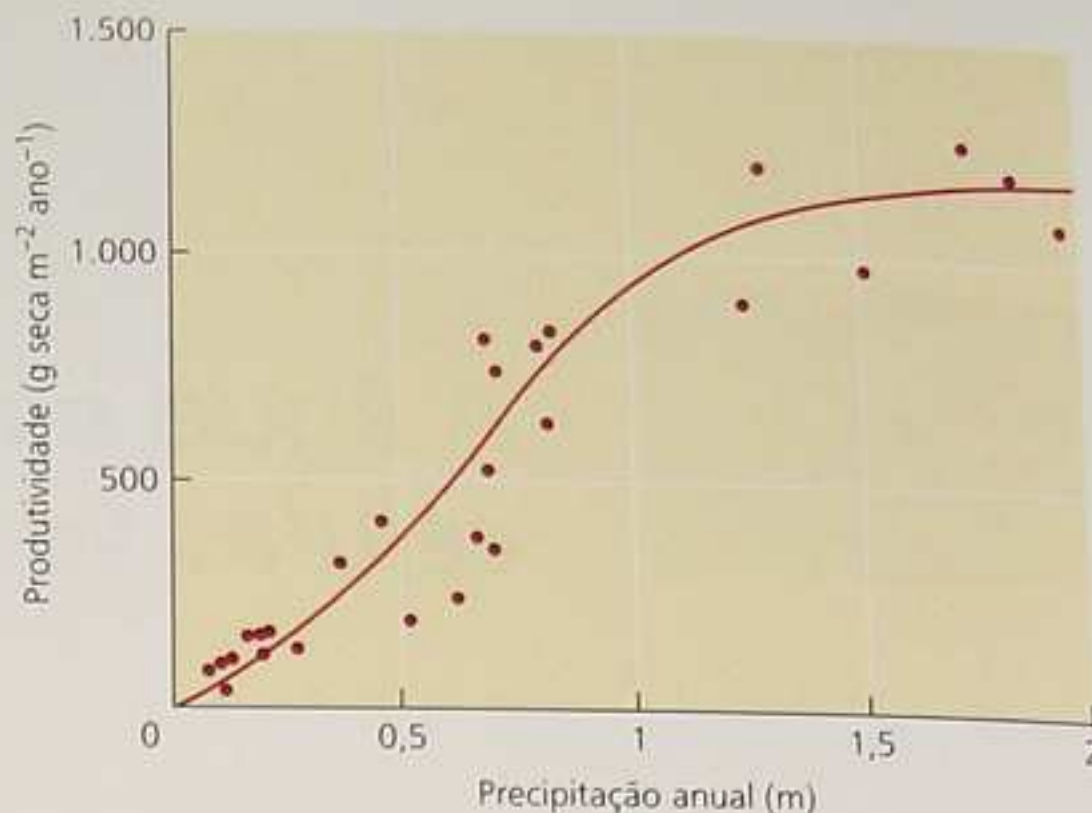
FIGURA 3.2 Produtividade de vários ecossistemas em função da precipitação anual. A produtividade foi estimada pelo acúmulo líquido de matéria orgânica acima do solo durante o crescimento e reprodução (Whittaker, 1970).

vez, tem conteúdo hídrico um pouco menor. As sementes, com conteúdo de água de 5 a 15%, estão entre os tecidos vegetais mais secos, mas antes de germinarem precisam absorver uma quantidade considerável de água.

A água é o mais abundante e, inquestionavelmente, o melhor solvente que se conhece. Como solvente, constitui o meio onde moléculas movimentam-se dentro de células e entre elas, influenciando grandemente a estrutura de proteínas, ácidos nucléicos, polissacarídeos e outros constituintes celulares. A água forma o ambiente onde ocorre a maioria das reações bioquímicas celulares e participa diretamente em muitas reações químicas essenciais.

As plantas absorvem e perdem água continuamente. A maioria da água perdida pela planta evapora da folha à medida que o CO_2 necessário à fotossíntese é absorvido da atmosfera. Em um dia ensolarado, quente e seco, uma folha renovará até 100% de sua água em apenas uma hora. Durante o período de vida da planta, uma quantidade de água equivalente a 100 vezes o peso fresco da mesma pode ser perdida através das superfícies foliares. Essa perda de água é chamada de transpiração.

A transpiração é uma forma eficiente de dissipar o calor proveniente do sol. O calor dissipa-se porque as moléculas de água que escapam para a atmosfera têm energia maior que a média, o que promove a quebra das ligações que as seguram no líquido. Quando tais moléculas escapam, elas deixam para trás uma massa de moléculas com energia menor que a média e, portanto, um corpo líquido mais frio. Para uma folha típica, quase metade do ganho líquido de calor do sol é dissipado pela transpiração. Além disso, a corrente de água absorvida pelas raízes é uma importante via de condução dos minerais dissolvidos do solo até a superfície radicular (ver Glossário), para absorção.

De todos os recursos de que a planta necessita para crescer e funcionar, a água é o mais abundante e, ao mesmo tempo, o mais limitante para a produtividade agrícola (Figura 3.1). O fato de a água ser limitante é o motivo pelo qual existem as práticas de irrigação de culturas. A disponibilidade de água igualmente limita a produtividade de ecossistemas naturais (Figura 3.2). Assim, a compreensão a respeito da absorção e perda de água pelas plantas é muito importante.

Este estudo da água começará levando em consideração como a sua estrutura dá origem a algumas de suas propriedades físicas singulares. Serão examinadas as bases físicas do movimento da água, o conceito de potencial hídrico e a aplicação desse conceito nas relações hídricas celulares.

A ESTRUTURA E AS PROPRIEDADES DA ÁGUA

A água tem propriedades especiais que lhe permitem atuar como um solvente e ser prontamente transportada ao longo do corpo da planta. Tais propriedades derivam primariamente da estrutura polar da molécula de água. Nesta seção, será examinado como a formação de ligações de hidrogênio contribui para aquelas propriedades da água que são necessárias à vida.

A polaridade das moléculas de água gera ligações de hidrogênio

A molécula de água consiste de um átomo de oxigênio ligado covalentemente a dois átomos de hidrogênio. As duas ligações O—H formam um ângulo de 105° (Figura 3.3). Por ser mais **eletronegativo** que o hidrogênio, o oxigênio tende a atrair os elétrons da ligação covalente. Essa atração resulta em uma carga negativa parcial na extremidade da molécula formada pelo oxigênio e em uma carga positiva parcial em cada hidrogênio. Essas cargas parciais são iguais, de forma que a molécula de água não possui carga *líquida*.

Essa separação de cargas parciais, juntamente com a forma da molécula de água, torna a água uma *molécula polar*, enquanto car-

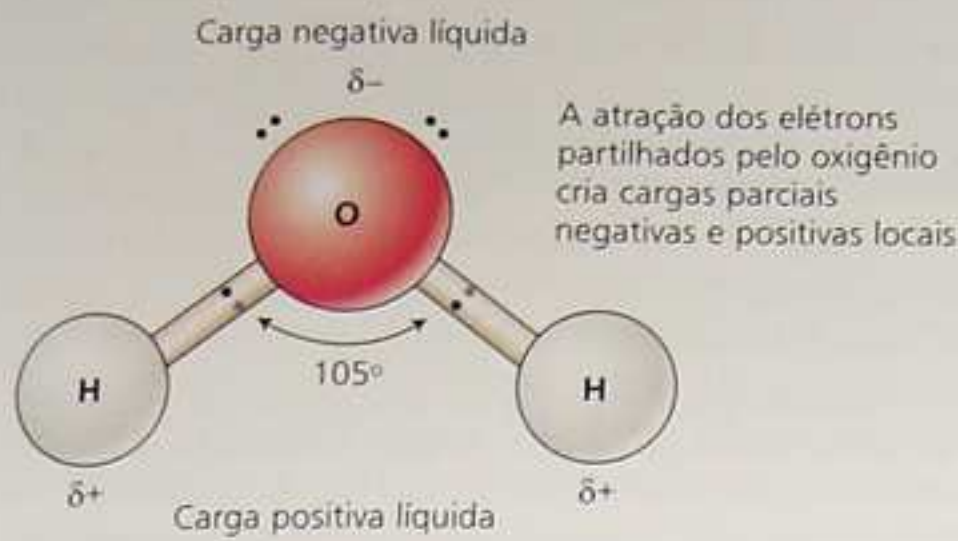
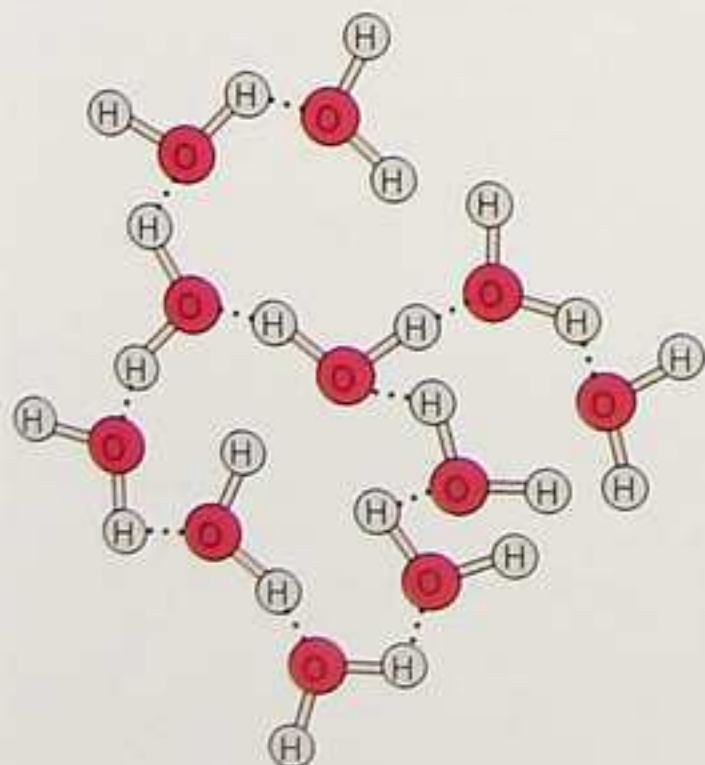
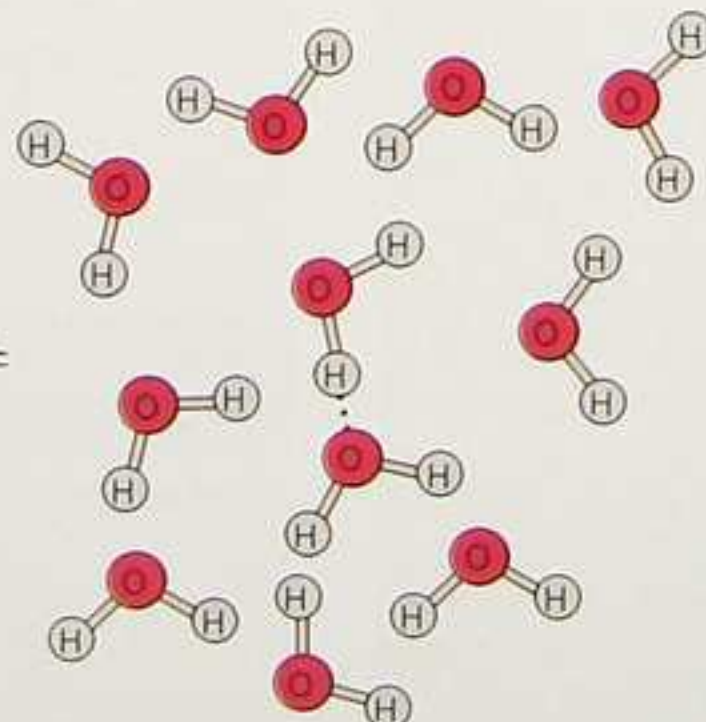



FIGURA 3.3 Diagrama da molécula de água. As duas ligações intramoleculares hidrogênio-oxigênio formam um ângulo de 105°. As cargas parciais opostas (δ- e δ+) na molécula de água levam à formação das ligações de hidrogênio com outras moléculas de água. O oxigênio tem seis elétrons nos orbitais externos; cada hidrogênio tem um.

gas parciais opostas entre moléculas de água vizinhas tendem a atraí-las mutuamente. A fraca atração eletrostática entre moléculas d'água, conhecida como **ligação de hidrogênio,** é responsável por muitas das propriedades físicas não-comuns da água.

Entre a água e outras moléculas que contenham átomos eletronegativos (O ou N) também podem-se formar ligações de hidrogênio. Em soluções aquosas, as ligações de hidrogênio entre moléculas de água geram agrupamentos ordenados locais de água, que, devido à agitação térmica contínua das moléculas de água, continuamente formam-se, quebram-se e se refazem (Figura 3.4).

A polaridade da água a torna um excelente solvente

A água é um excelente solvente: ela dissolve quantidades maiores de uma variedade mais ampla de substâncias que outros solventes correlatos. Essa versatilidade como solvente deve-se, em parte, ao pequeno tamanho da molécula de água e, em parte, à sua natureza polar. Esta última faz da água um solvente particularmente bom para substâncias iônicas e para moléculas como açúcares e proteínas, que contêm grupos polares —OH ou $—NH_2$.

As ligações de hidrogênio entre moléculas de água e íons e entre água e solutos polares em solução efetivamente reduzem a atração eletrostática entre substâncias carregadas e, portanto, aumentam a sua solubilidade. Além disso, as extremidades polares das moléculas de água podem orientá-las para perto de grupos carregados ou parcialmente carregados de macromoléculas, formando **capas de hidratação**. As ligações de hidrogênio entre macromoléculas e água reduzem a interação entre as macromoléculas e ajudam a trazê-las para a solução.

As propriedades térmicas da água resultam das ligações de hidrogênio

As numerosas ligações de hidrogênio entre as moléculas de água resultam em propriedades térmicas incomuns, tais como o alto calor específico e o alto calor latente de vaporização. **Calor específico** é o calor necessário para aumentar a temperatura de uma substância em uma quantidade específica.

Quando a temperatura da água é aumentada, as moléculas vibram mais rapidamente e com maior amplitude. Para permitir essa movimentação, precisa ser adicionada energia ao sistema para quebrar as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água. Assim, comparada com outros líquidos, a água requer uma adição de energia relativamente grande para aumentar a sua temperatura. Tal exigência de grande adição de energia é importante para as plantas, porque ajuda a tamponar as flutuações de temperatura.

O **calor latente de vaporização** é a energia necessária para separar as moléculas da fase líquida e levá-las para a fase gasosa à temperatura constante — um processo que ocorre durante a transpiração. Para água a 25 °C, o calor de vaporização é 44 kJ mol^{-1} — o valor mais alto conhecido para líquidos. A maior parte dessa energia é utilizada para quebrar as ligações de hidrogênio entre moléculas de água.

O alto calor latente de vaporização da água permite às plantas se refrescarem por evaporação da água das superfícies foliares, as quais estão sujeitas a aquecer por causa do acréscimo de radiação proveniente do sol. A transpiração é um componente importante da regulação térmica das plantas.

FIGURA 3.4 (A) As ligações de hidrogênio entre moléculas de água resultam em agregações locais de moléculas de água. (B) Devido à agitação térmica contínua das moléculas de água, essas agregações têm vida curta; elas se quebram rapidamente, formando configurações muito mais aleatórias.

As propriedades de coesão e adesão da água são devidas às ligações de hidrogênio

As moléculas de água na interface ar-água são mais fortemente atraídas às moléculas vizinhas que à fase gasosa em contato com a superfície da água. Como conseqüência dessa atração desigual, a interface ar-água minimiza sua área superficial. Para aumentar a área de superfície de uma interface ar-água, ligações de hidrogênio precisam ser quebradas, o que requer um acréscimo de energia. A energia necessária para aumentar a área de superfície é conhecida como **tensão superficial**. A tensão superficial não apenas influencia a forma da superfície, mas também pode gerar uma pressão sobre o restante do líquido. Conforme se verá mais tarde, a tensão superficial nas superfícies de evaporação das folhas gera as forças físicas que puxam a água pelo sistema vascular das plantas.

A grande formação de ligações de hidrogênio na água também dá origem à propriedade conhecida como **coesão**, atração mútua entre moléculas. Uma propriedade relacionada, chamada de **adesão**, refere-se à atração da água a uma fase sólida, como a parede celular ou a superfície de um vidro. Coesão, adesão e tensão superficial originam um fenômeno conhecido como **capilaridade**, movimento da água ao longo de um tubo capilar.

Em um tubo capilar de vidro verticalmente orientado, o movimento ascendente de água é devido (1) à atração da água à superfície polar do tubo de vidro (adesão) e (2) à tensão superficial da água, que tende a minimizar a área da interface ar-água. Juntas, adesão e tensão superficial puxam as moléculas de água, fazendo com que elas subam pelo tubo até que a força de ascensão seja balanceada pelo peso da coluna de água. Quanto menor o tubo*, maior a ascensão capilar. Para cálculos relacionados à ascensão capilar, ver o **Tópico 3.1 na Internet**.

A água tem uma grande resistência à tensão

A coesão proporciona à água uma grande resistência à tensão, definida como a força máxima por unidade de área que uma coluna de água pode suportar antes de quebrar. Normalmente, não se pensa em líquidos como tendo força de tração; entretanto, tal propriedade deve existir para que uma coluna de água seja elevada em um tubo capilar.

É possível demonstrar a força de tração da água colocando-a em uma seringa tampada (Figura 3.5). Quando o êmbolo é empurrado, a água é comprimida e se desenvolve uma pressão hidrostática positiva. A pressão é medida em unidades chamadas *pascais* (Pa) ou, mais convenientemente, *megapascais* (MPa). Um MPa equivale a aproximadamente 9,9 atmosferas. A pressão equivale à força por unidade de área (1Pa= 1 N m^{-2}) ou à energia por unidade de volume (1Pa = 1 J m^{-3}). Um newton (N) é igual a 1 kg m s^{-1}. A Tabela 3.1 compara unidades de pressão.

Se o êmbolo for puxado, em vez de ser empurrado, desenvolve-se uma tensão na água, ou *pressão hidrostática negativa*, para resistir à tração. Quão forte deve-se puxar o êmbolo antes que as moléculas de água separem-se uma das outras e a coluna de água se quebre? Quebrar uma coluna de água requer energia suficiente para romper as ligações de hidrogênio que atraem as moléculas de água umas às outras.

*N. de T. A dimensão do tubo em questão é o seu diâmetro.

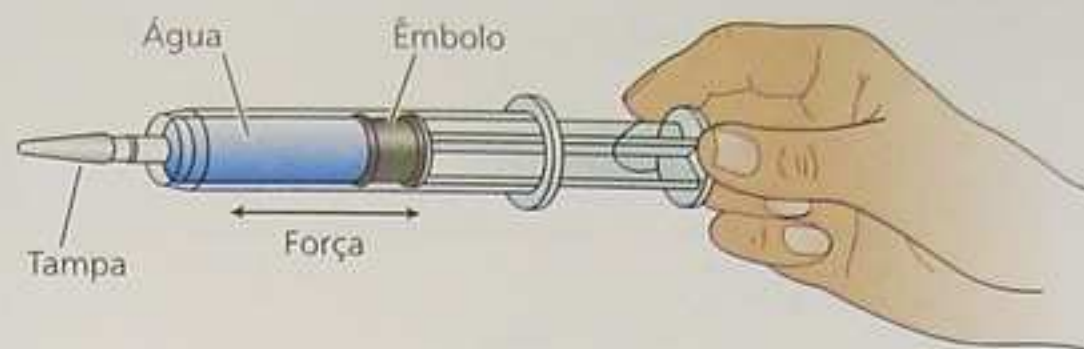



FIGURA 3.5 Uma seringa selada pode ser usada para criar pressões positivas e negativas em um fluido como a água. Ao ser empurrado, o êmbolo comprime o fluido e se desenvolve uma pressão positiva. Se uma pequena bolha de ar é aprisionada dentro da seringa, ela encolhe à medida que a pressão aumenta. Ao puxar o êmbolo, o fluido desenvolve uma tensão ou pressão negativa. Qualquer bolha de ar presente na seringa expandirá à medida que a pressão é reduzida.

Estudos cuidadosos demonstraram que a água em pequenos capilares pode resistir a tensões mais negativas do que –30 MPa (o sinal negativo indica tensão, em oposição à compressão). Tal valor é apenas uma fração da força de tração teórica da água, computada com base na força das ligações de hidrogênio; no entanto, é bastante substancial.

A presença de bolhas de ar reduz a força de tração de uma coluna de água. Por exemplo, na seringa ilustrada na Figura 3.5, a expansão de bolhas microscópicas normalmente interfere na capacidade da água de resistir à tensão exercida pelo êmbolo. Se uma minúscula bolha de ar forma-se na coluna de água sob tensão, essa bolha de ar pode se expandir indefinidamente, resultando no colapso da tensão da fase líquida, fenômeno conhecido como **cavitação**. Como se verá no Capítulo 4, a cavitação pode ter um efeito devastador sobre o transporte de água ao longo do xilema.

PROCESSOS DE TRANSPORTE DE ÁGUA

Quando a água move-se do solo, através da planta, até a atmosfera, ela se move por meios amplamente variáveis (parede celular, citoplasma, membrana, espaços de aeração) e os mecanismos que a transportam também variam com o tipo de meio. O movimento da água nas membranas vegetais há muito tem despertado o interesse de pesquisadores. Especificamente, havia dúvida se o

TABELA 3.1
Comparação de unidades de pressão

1 atmosfera	=	14,7 libras por polegada quadrada
	=	760 mm Hg (no nível do mar, 45° de latitude)
	=	1,013 bar
	=	0,1013 MPa
	=	1,013 × 10^5 Pa

Um pneu de carro é tipicamente inflado a cerca de 0,2 MPa.
A pressão da água em encanamentos caseiros é tipicamente 0,2-0,3 MPa.
A pressão de água a 15 pés (5 m) de profundidade é de cerca de 0,05 MPa.

movimento de água para dentro das células limitava-se à difusão de moléculas de água por meio da dupla camada lipídica da membrana plasmática ou se também envolvia difusão pelos poros protéicos (Figura 3.6).

Alguns estudos indicaram que a difusão diretamente por meio da dupla camada lipídica não era suficiente para explicar as taxas de movimento de água observadas pelas membranas, mas a evidência em favor de poros microscópicos não era convincente. Essa incerteza foi desfeita com a descoberta recente das aquaporinas (ver Figura 3.6), que são proteínas integrais de membrana, as quais formam canais seletivos à água por intermédio da membrana. Uma vez que a água difunde-se mais rapidamente através desses canais do que pela dupla camada lipídica, as **aquaporinas** facilitam o movimento de água para dentro das células vegetais (Weig e cols., 1997; Schäffner, 1998; Tyerman e cols., 1999). Note que embora a presença de aquaporinas possa alterar a *taxa* de movimento da água por meio da membrana, elas não mudam a direção de transporte ou a força propulsora para movimento da água. O modo de ação das aquaporinas está sendo ativamente pesquisado (Tajkhorshid e cols., 2002).

Agora, serão considerados os dois processos principais no transporte de água: difusão molecular e fluxo de massa.

Difusão é um movimento de moléculas por agitação térmica aleatória

As moléculas de água em uma solução não são estáticas; elas estão em contínuo movimento, colidindo umas com as outras e trocando energia cinética. As moléculas misturam-se como resultado da agitação térmica aleatória das mesmas. Este movimento aleatório é chamado de **difusão**. Desde que outras forças não estejam agindo sobre as moléculas, a difusão causa o movimento líquido de moléculas de regiões de alta concentração para regiões de baixa concentração — ou seja, ao longo de um gradiente de concentração (Figura 3.7).

Na década de 1880, o cientista alemão Adolf Fick descobriu que a taxa de difusão é diretamente proporcional ao gradiente de concentração ($\Delta c_s/\Delta x$) — ou seja, à diferença de concentração da substância *s* (Δc_s) entre dois pontos separados pela distância Δx. Esta relação é conhecida como a primeira lei de Fick:

$$J_s = -D_s \frac{\Delta c_s}{\Delta x} \quad (3.1)$$

A taxa de transporte, ou a **densidade de fluxo** (J_s), e a quantidade da substância *s* que atravessa uma unidade de área por unidade de tempo (p. ex., J_s pode ter unidades de moles por metro quadrado por segundo [mol m^{-2} s^{-1}]). O **coeficiente de difusão** D_s é uma constante de proporcionalidade que mede o quão facilmente a substância *s* move-se através de um determinado meio. O coeficiente de difusão é uma característica da substância (moléculas maiores têm menores coeficientes de difusão) e depende do meio (difusão em ar é muito mais rápida que difusão em líquido, por exemplo). O sinal negativo na equação indica que o fluxo ocorre a favor de um gradiente de concentração.

A primeira lei de Fick diz que uma substância difundir-se-á mais rapidamente quando o gradiente de concentração tornar-se mais acentuado (Δc_s grande) ou quando o coeficiente de difusão for aumentado. Essa equação contabiliza apenas o movimento em resposta a um gradiente de concentração e não movimentos em resposta a outras forças (p. ex., pressão, campos elétricos e assim por diante).

A difusão é rápida para curtas distâncias, mas extremamente lenta para longas distâncias

Da primeira lei de Fick, pode se derivar uma expressão para o tempo requerido por uma substância para difundir-se ao longo de uma distância específica. Se as condições iniciais são tais que todas as moléculas de soluto estão concentradas no ponto inicial (Figura 3.8A), a frente de concentração move-se para longe do ponto inicial, conforme mostrado para um tempo posterior na Figura 3.8B. À medida que a substância distancia-se do ponto inicial, o gradiente de concentração torna-se menos acentuado (Dc_s decresce) e, assim, o movimento líquido fica mais lento.

O tempo médio necessário para uma partícula difundir-se por uma distância *L* é igual a L^2/D_s, onde D_s é o coeficiente de difusão, o qual depende tanto da identidade da partícula quanto do meio onde esta se difunde. Deste modo, o tempo médio exigido para uma substância se difundir por uma determinada distância aumenta em proporção ao *quadrado* da distância. O coeficiente de difusão para a glicose em água é cerca de 10^{-9} m^2 s^{-1}. Assim, o tempo médio necessário para que uma molécula de glicose difunda-se através de uma célula com diâmetro de 50 µm é 2,5 s. Entretanto, o tempo médio requerido pela mesma molécula de glicose para se difundir por uma distância de 1 m em água é de aproximadamente 32 anos. Tais valores mostram que a difusão em soluções pode ser eficaz dentro de dimensões celulares, mas é demasiado lenta para o transporte de massa a longas distâncias. Para cálculos adicionais de tempos de difusão, ver o **Tópico 3.2 na Internet**.

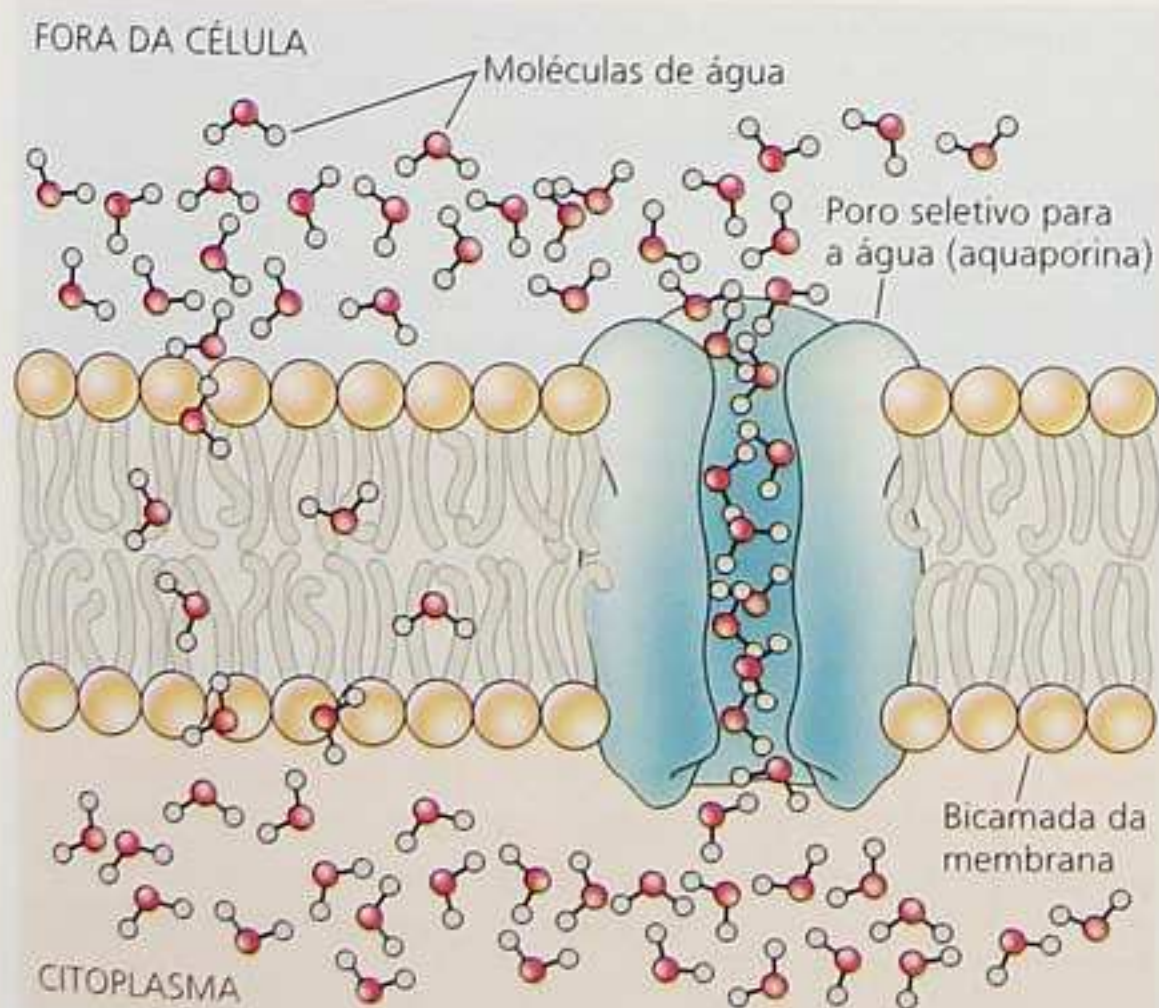



FIGURA 3.6 A água pode atravessar membranas vegetais por difusão de suas moléculas individuais por meio da bicamada lipídica da membrana, conforme mostrado à esquerda, ou por fluxo microscópico de massa de moléculas de água através de poros seletivos para a água, formados por proteínas integrais de membranas como as aquaporinas.

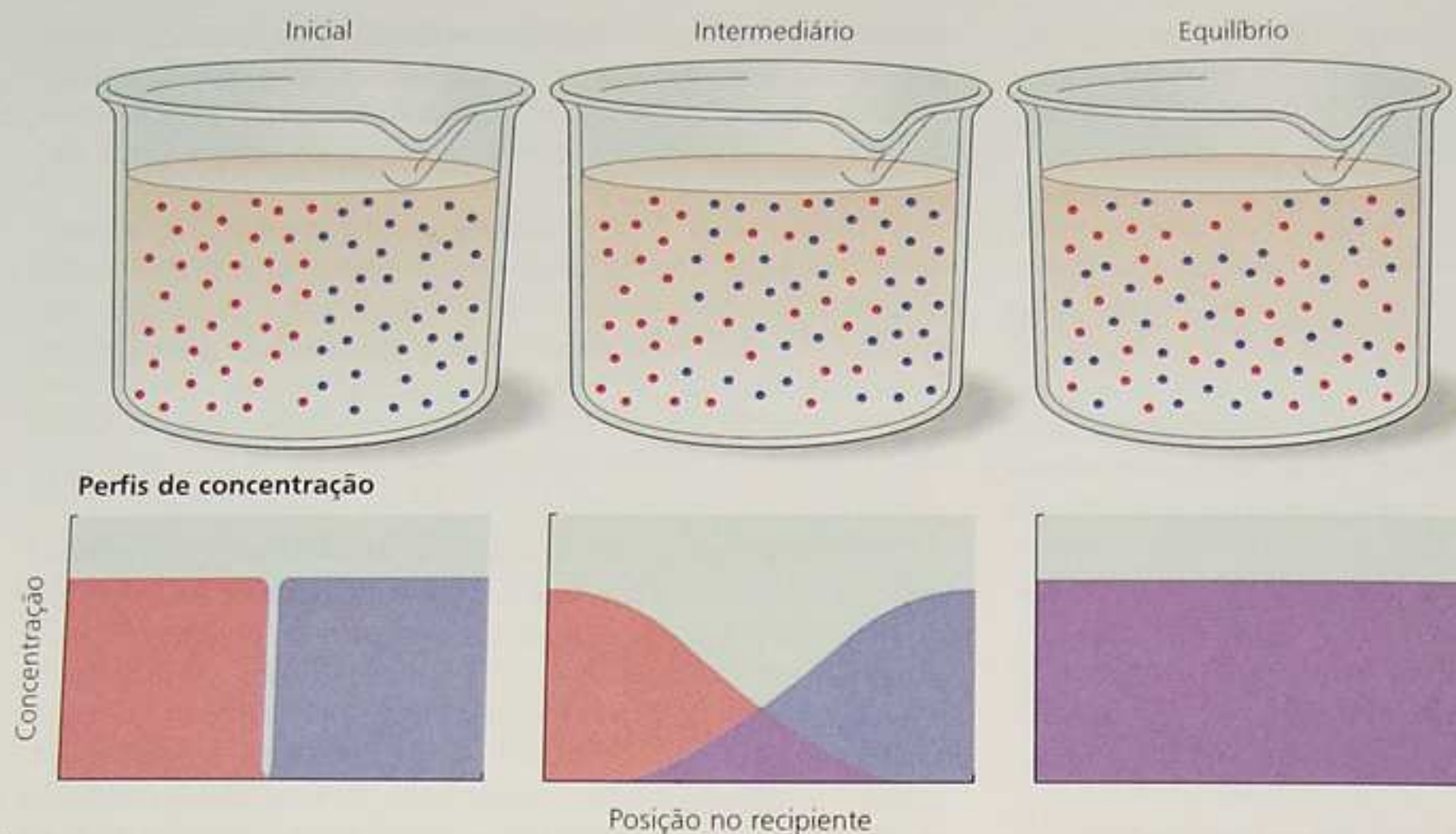



FIGURA 3.7 O movimento térmico de moléculas leva à difusão — a mistura gradual de moléculas e eventual dissipação de diferenças de concentração. Inicialmente, dois materiais contendo moléculas diferentes são postos em contato. Esses materiais podem ser sólidos, líquidos ou gasosos. A difusão em gases ocorre com maior rapidez, em líquido dá-se de forma mais lenta, mas é em sólidos que a lentidão é ainda maior. A separação inicial das moléculas é visualizada graficamente nos painéis superiores e os perfis de concentração correspondentes são mostrados nos inferiores, em função da posição. Com o tempo, a mistura e a aleatorização das moléculas diminui o movimento líquido. Na situação de equilíbrio, os dois tipos de moléculas estão aleatoriamente (uniformemente) distribuídos.

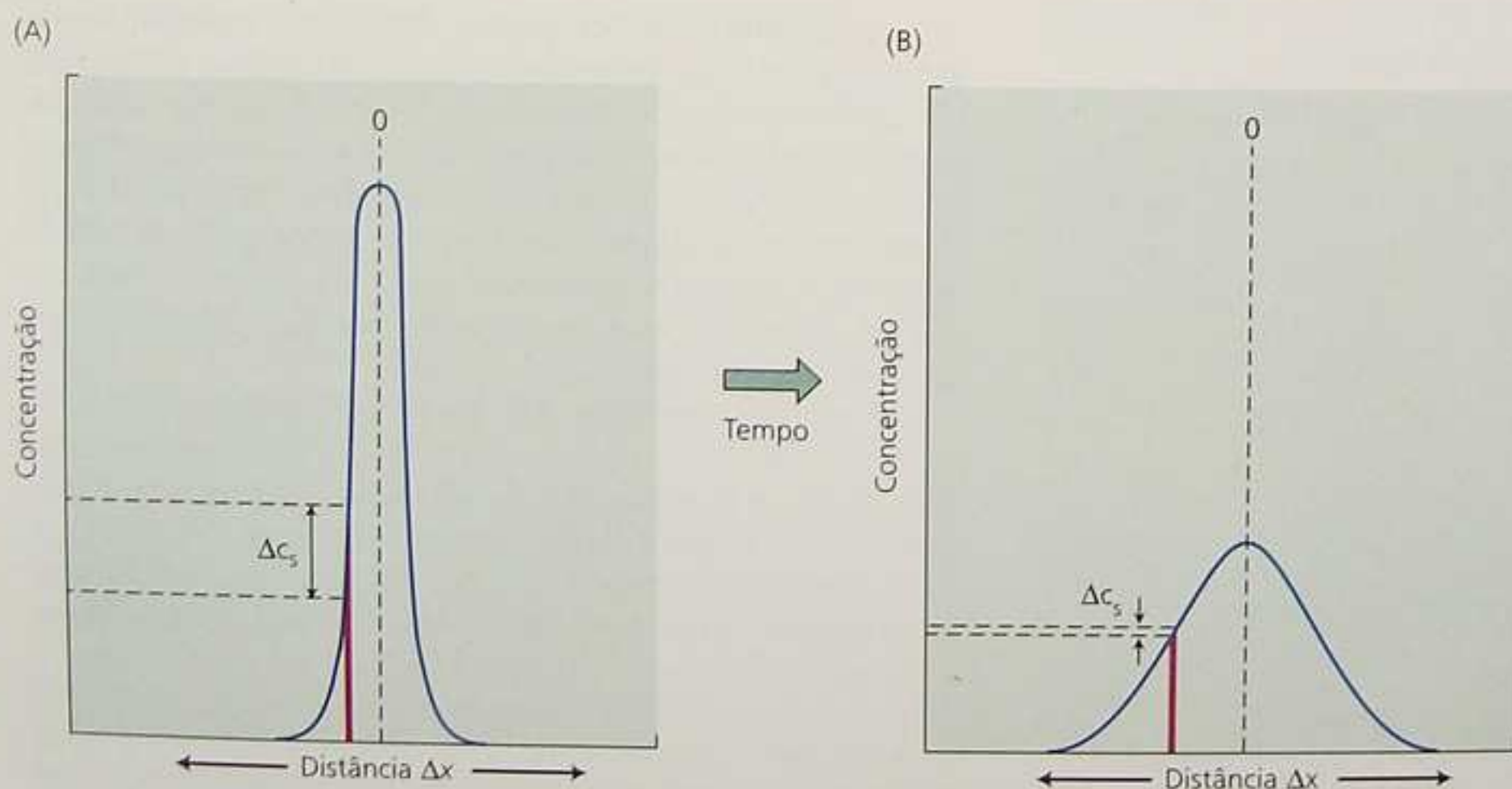



FIGURA 3.8 Representação gráfica do gradiente de concentração de um soluto que se difunde de acordo com a lei de Fick. As moléculas de soluto foram inicialmente colocadas no plano indicado no eixo x. (A) A distribuição das moléculas de soluto logo após o posicionamento no plano de origem. Observe que a concentração cai abruptamente à medida que a distância, x, da origem aumenta. (B) A distribuição do soluto em um ponto de tempo mais tarde. A distância média da origem das moléculas em difusão aumentou e a inclinação do gradiente tornou-se bem menos acentuada (Nobel, 1999).

O fluxo de massa governado por pressão determina o transporte de água de longa distância

Um segundo processo pelo qual a água se movimenta é conhecido como **fluxo de massa**. Fluxo de massa é, pois, o movimento em conjunto de grupos de moléculas em massa, mais comumente em resposta a um gradiente de pressão. Entre vários exemplos comuns de fluxo em massa, destacam-se o movimento de água por meio de uma mangueira de jardim, o fluxo de um rio e a chuva caindo.

Se for considerado o fluxo de massa em um tubo, a taxa de fluxo de volume depende do raio (r) do tubo, da viscosidade (η) do líquido e do gradiente de pressão ($\Delta\Psi_p/\Delta x$), que governa o fluxo. Jean-Léonard-Marie Poiseuille (1797-1869) foi um médico e fisiologista francês, e a relação desse processo é dada pela equação que leva o seu nome:

$$\text{Taxa de fluxo de volume} = \left(\frac{\pi r^4}{8\eta}\right)\left(\frac{\Delta\Psi_p}{\Delta x}\right) \quad (3.2)$$

expressa em metros cúbicos por segundo ($m^3\ s^{-1}$). A equação mostra que o fluxo de massa governado por pressão é muito sensível ao raio do tubo. Se o raio é duplicado, a taxa de fluxo de volume aumenta por um fator de 16 (2^4).

O fluxo de massa da água movido por pressão é o principal mecanismo responsável pelo transporte de longa distância da água no xilema. Ele também explica a maior parte do fluxo de água no solo e nas paredes celulares de tecidos vegetais. Em contraste com a difusão, o fluxo de massa por pressão é independente de gradientes de concentração de soluto, desde que mudanças na viscosidade sejam desprezíveis.

A osmose é governada por um gradiente de potencial hídrico

As membranas das células vegetais são **seletivamente permeáveis;** ou seja, elas permitem o movimento de água e de outras substâncias pequenas, sem carga, através delas mais prontamente do que o movimento de solutos maiores e de substâncias com carga (Stein, 1986).

Da mesma forma que a difusão molecular e o fluxo de massa por pressão, a **osmose** ocorre espontaneamente em resposta a uma força propulsora. Na difusão simples, substâncias movem-se a favor de um gradiente de concentração; no fluxo de massa por pressão, substâncias movem-se a favor de um gradiente de pressão; na osmose, os dois tipos de gradientes influenciam o transporte (Finkelstein, 1987). *A direção e a taxa de fluxo de água através de uma membrana não são determinadas somente pelo gradiente de concentração de água ou pelo gradiente de pressão, mas pela soma dessas duas forças propulsoras.*

Em seguida, ver-se-á como a osmose governa o movimento de água através de membranas. Primeiro, no entanto, discutir-se-á o conceito de uma força propulsora composta ou total, que representa o gradiente de energia livre da água.

O potencial químico da água representa o *status* da energia livre da água

Todas as coisas vivas, incluindo as plantas, requerem uma adição contínua de energia livre para manterem e repararem suas estruturas altamente organizadas, assim como para crescerem e se reproduzirem. Processos como reações bioquímicas, acúmulo de solutos e transporte de longa distância são todos movidos por um acréscimo de energia livre na planta (para uma discussão detalhada do conceito termodinâmico de energia livre, ver **Capítulo 2 na Internet**).

O **potencial químico** da água é uma expressão quantitativa da energia livre a ela associada. Em termodinâmica, energia livre representa o potencial para realizar trabalho. Observe que o potencial químico é uma grandeza relativa: ela é expressa como a diferença entre o potencial de uma substância em um determinado estado e o potencial químico da mesma substância em um estado padrão. A unidade de potencial químico é energia por mol de substância ($J\ mol^{-1}$).

Por razões históricas, os fisiologistas vegetais têm usado mais comumente um parâmetro relacionado, denominado **potencial hídrico,** definido como o potencial químico da água dividido pelo volume molal parcial da água (o volume de 1 mol de água): $18 \times 10^{-6}\ m^3\ mol^{-1}$. O potencial hídrico é uma medida da energia livre da água por unidade de volume ($J\ m^{-3}$). Essas unidades são equivalentes a unidades de pressão como o pascal, que é a unidade de medida comum para potencial hídrico. O importante conceito de potencial hídrico será considerado mais detalhadamente.

Três fatores principais contribuem para o potencial hídrico celular

Os principais fatores que influenciam o potencial hídrico em plantas são *concentração*, *pressão* e *gravidade*. O potencial hídrico é simbolizado por Ψ_w (letra grega *psi*) e o potencial hídrico de soluções pode ser dividido em componentes individuais, sendo normalmente escrito pelo seguinte somatório:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g \quad (3.3)$$

Os termos Ψ_s, Ψ_p e Ψ_g expressam os efeitos de solutos, pressão e gravidade, respectivamente, sobre a energia livre da água (convenções alternativas para os componentes do potencial hídrico são discutidos no **Tópico 3.3 na Internet**). O estado referencial utilizado para definir potencial hídrico é água pura sob pressão e temperatura ambientes. Será considerado cada um dos termos do lado direito da Equação 3.3.

Solutos. O termo Ψ_s, chamado de **potencial de soluto** ou **potencial osmótico,** representa o efeito de solutos dissolvidos no potencial hídrico. Os solutos reduzem a energia livre da água por diluição da mesma. Esse é primariamente um efeito de entropia; ou seja, a mistura de solutos e água aumenta a desordem do sistema e, portanto, reduz a energia livre. Isto significa que o potencial osmótico é independente da natureza específica do soluto. Para soluções diluídas de substâncias indissociáveis, como a sacarose, o potencial osmótico pode ser estimado pela **equação de van´t Hoff:**

$$\Psi_\sigma = -RTc_s \quad (3.4)$$

onde R é a constante dos gases ($8{,}32\ J\ mol^{-1}\ K^{-1}$), T é a temperatura absoluta (em graus Kelvin or K) e c_s é a concentração de solutos da solução, expressa como **osmolalidade** (moles de solutos totais dissolvidos por litro de água [$mol\ L^{-1}$]). O sinal negativo indica que os solutos dissolvidos reduzem o potencial hídrico da solução em relação ao estado de referência da água pura.

A Tabela 3.2 mostra os valores de RT a várias temperaturas e os valores de Ψ_s de soluções de diferentes concentrações de solutos. Para solutos iônicos que se dissociam em duas ou mais partículas, c_s precisa ser multiplicado pelo número de partículas dissociadas para levar em consideração o aumento no número de partículas dissolvidas.

A Equação 3.4 é válida para soluções "ideais" a concentrações diluídas. Soluções reais freqüentemente desviam-se das ideais, especialmente a altas concentrações — por exemplo, maiores do que 0,1 mol L^{-1}. No nosso tratamento de potencial hídrico, assumir-se-á que se está lidando com soluções ideais (Friedman, 1986; Nobel, 1999).

Pressão. O termo Ψ_p é a **pressão hidrostática** da solução. Pressões positivas aumentam o potencial hídrico; pressões negativas reduzem-na. Às vezes, Ψ_p é chamado de *potencial de pressão*. A pressão hidrostática positiva dentro de células é aquela que se refere à *pressão de turgor*. O valor de Ψ_p também pode ser negativo, tal como ocorre no xilema e nas paredes entre as células, onde uma *tensão* ou *pressão hidrostática negativa* pode se desenvolver. Conforme será visto, pressões negativas fora das células são muito importantes para o movimento de água de longa distância na planta.

A pressão hidrostática é medida como desvio da pressão ambiente (para detalhes, ver o **Tópico 3.5 na Internet**). Lembre-se de que a água em seu estado de referência está à pressão ambiente, de forma que, de acordo com esta definição, $\Psi_p = 0$ MPa para água em condição padrão. Assim, o valor de Ψ_p para água pura em um béquer aberto é de 0 MPa, embora sua pressão absoluta seja de aproximadamente 0,1 MPa (1 atmosfera).

Gravidade. A gravidade faz com que a água mova-se para baixo, a não ser que à força da gravidade se oponha uma força igual e oposta. O termo Ψ_g depende da altura (h) da água acima dela no estado de referência, da densidade da água (ρ_w) e da aceleração da gravidade (g). Em símbolos, escreve-se:

$$\Psi_g = \rho_w g h \quad (3.5)$$

onde $\rho_w g$ tem um valor de 0,01 MPa m^{-1}. Assim, uma distância vertical de 10 m traduz-se em uma mudança de 0,1 MPa no potencial hídrico.

Quando se lida com o transporte de água em nível celular, o componente gravitacional (Ψ_g) é geralmente omitido porque é desprezível comparado ao potencial osmótico e à pressão hidrostática. Assim, nesses casos a Equação 3.3 pode ser simplificada como segue:

$$\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p \quad (3.6)$$

Em discussões sobre solos secos, sementes e paredes celulares é comum encontrar-se referência a um outro componente do Ψ_w, o potencial mátrico, o qual é discutido no **Tópico 3.5 na Internet.**

Potencial hídrico na planta. Crescimento celular, fotossíntese e produtividade de cultivos são todos fortemente influenciados pelo potencial hídrico e seus componentes. Da mesma foram que a temperatura corporal humana, o potencial hídrico é um bom indicador geral da saúde da planta. Assim, os botânicos têm despendido considerável esforço no desenvolvimento de métodos acurados e confiáveis na avaliação do *status* hídrico das plantas. Alguns dos instrumentos que têm sido usados para medir Ψ_w, Ψ_s e Ψ_p estão descritos no **Tópico 3.5 na Internet**.

A água entra na célula ao longo de um gradiente de potencial hídrico

Nesta seção, o comportamento osmótico de células vegetais será ilustrado com alguns exemplos numéricos. Primeiro, imagine um béquer aberto, cheio de água pura a 20 °C (Figura 3.9A). Uma vez que a água está aberta para a atmosfera, sua pressão hidrostática é a mesma que a pressão atmosférica ($\Psi_p = 0$ MPa). Não há solutos na água e, assim, $\Psi_s = 0$ MPa; portanto, o potencial hídrico é 0 MPa ($\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$).

Agora, imagine dissolver sacarose na água até uma concentração de 0,1 *M* (Figura 3.9B). Essa adição reduz o potencial osmótico (Ψ_s) para –0,244 MPa (ver Tabela 3.2) e reduz o potencial hídrico (Ψ_w) para –0,244 MPa.

A seguir, considere uma célula vegetal flácida ou murcha (i. é, uma célula sem pressão de turgor) com uma concentração interna total de solutos de 0,3 *M* (Figura 3.9C). Tal concentração de solutos gera um potencial osmótico (Ψ_s) de –0,732 MPa. Em decorrência de a célula ser flácida, a pressão interna é a mesma que a pressão ambiente, de forma que a pressão hidrostática (Ψ_p) é 0 MPa, e o potencial hídrico, –0,732 MPa.

TABELA 3.2
Valores de *RT* e potencial osmótico de soluções sob temperaturas variadas

Temperatura (°C)	RT[a] (L MPa mol^{-1})	Potencial osmótico (MPa) da solução com concentração de soluto em mol L^{-1} de água: 0,01	0,10	1,00	Potencial osmótico da água do mar (MPa)
0	2,271	–0,0227	–0,227	–2,27	–2,6
20	2,436	–0,0244	–0,244	–2,44	–2,8
25	2,478	–0,0248	–0,248	–2,48	–2,8
30	2,519	–0,0252	–0,252	–2,52	–2,9

[a]R = 0,0083143 L MPa mol^{-1} K^{-1}.

(A) **Água pura**

Água pura
Ψ_p = 0 MPa
Ψ_s = 0 MPa
$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_s$
= 0 MPa

(B) **Solução contendo sacarose 0,1 *M***

Solução 0,1 *M* de sacarose
Ψ_p = 0 MPa
Ψ_s = −0.244 MPa
$\Psi_w = \Psi_p + \Psi_s$
= 0 − 0.244 MPa
= −0.244 MPa

(C) **Célula flácida mergulhada em solução de sacarose**

Célula flácida
Ψ_p = 0 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
Ψ_w = −0.732 MPa

Célula após o equilíbrio
Ψ_w = −0.244 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = 0.488 MPa

(D) **Solução de sacarose aumentada**

Célula túrgida
Ψ_p = 0.488 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
Ψ_w = −0.244 MPa

Célula após o equilíbrio
Ψ_w = −0.732 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = 0 MPa

Solução 0,3 *M* de sacarose
Ψ_p = 0 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
Ψ_w = −0.732 MPa

(E) **Pressão aplicada à célula**

Pressão aplicada retira metade da água, dobrando, assim, o Ψ_s de −0.732 para −1.464 MPa

Solução 0,1 *M* de sacarose

Célula no estado inicial
Ψ_w = −0.244 MPa
Ψ_s = −0.732 MPa
$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = 0.488 MPa

Célula no estado final
Ψ_w = −0.244 MPa
Ψ_s = −1.464 MPa
$\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = 1.22 MPa

FIGURA 3.9 Cinco exemplos ilustram o conceito de potencial hídrico e seus componentes. (A) Água pura. (B) Solução contendo 0,1 *M* de sacarose. (C) Célula flácida (em ar) é mergulhada na solução 0,1 *M* de sacarose. Uma vez que o potencial hídrico inicial da célula é menor que o potencial hídrico da solução, a célula absorve água. Após o equilíbrio, o potencial hídrico da célula aumenta para igualar o potencial hídrico da solução. O resultado é uma célula com uma pressão de turgor positiva. (D) O aumento da concentração de sacarose na solução faz a célula perder água. O aumento da concentração de sacarose baixa o potencial hídrico da solução, retira água da célula e, portanto, reduz a pressão de turgor celular. No caso, o protoplasto é capaz de se afastar da parede celular (i. é, a célula plasmoliza), pois moléculas de sacarose são capazes de passar pelos poros relativamente grandes das paredes celulares. Por outro lado, quando uma célula seca ao ar (p. ex., a célula flácida no painel C), a plasmólise não ocorre, uma vez que a água retida por forças capilares na parede celular impede a infiltração do ar para dentro de qualquer espaço vazio entre a membrana plasmática e a parede celular. (E) Uma outra forma de fazer uma célula perder água é pressioná-la lentamente entre duas placas. Nesse caso, metade da água celular é removida, de forma que o potencial osmótico aumenta por um fator 2.

O que acontece se essa célula é colocada em um béquer contendo sacarose 0,1 *M* (ver Figura 3.9C)? Por ser o potencial hídrico da solução de sacarose (Ψ_w = –0,244 MPa; ver Figura 3.9B) maior que o potencial hídrico da célula (Ψ_w = –0,732 MPa), a água vai mover-se da solução de sacarose para a célula (de um alto para um baixo potencial hídrico).

Por serem as células vegetais circundadas por paredes celulares relativamente rígidas, mesmo um pequeno aumento no volume celular provoca um grande aumento na pressão hidrostática dentro da célula. À medida que a água entra na célula, a parede celular é distendida pelo conteúdo do protoplasto em aumento. A parede resiste a tal distensão pressionando de volta a célula. Tal fenômeno é análogo ao inflar de uma bola de basquete com ar, exceto que o ar é compressível, enquanto a água é quase incompressível.

À medida que a água entra na célula, a pressão hidrostática ou pressão de turgor (Ψ_p) da célula aumenta. Conseqüentemente, o potencial hídrico celular (Ψ_w) aumenta e a diferença entre os potenciais hídricos interno e externo ($\Delta\Psi_w$) é reduzida. Em um determinado momento, o Ψ_p celular aumenta o suficiente para aumentar o Ψ_w celular para o mesmo valor de Ψ_w da solução de sacarose. Nesse ponto, o equilíbrio é atingido ($\Delta\Psi_w$ = 0 MPa) e o transporte líquido da água cessa.

Devido ao volume do béquer ser muito maior que o da célula, a minúscula quantidade de água absorvida pela célula não afeta significativamente a concentração de soluto da solução de sacarose. Assim, Ψ_s, Ψ_p e Ψ_w da solução de sacarose não são alterados. Portanto, no equilíbrio, $\Psi_{w(célula)} = \Psi_{w(solução)}$ = –0,244 MPa.

O cálculo exato do Ψ_p e Ψ_s requer conhecimento da mudança do volume celular. No entanto, admitir-se que a célula tem uma parede celular muito rígida, então o aumento no volume celular será muito pequeno. Assim, pode-se assumir em uma primeira aproximação que o $\Psi_{s(célula)}$ não é alterado durante o processo de equilíbrio e que o $\Psi_{s(solução)}$ permanece a –0,732 MPa. Pode-se obter a pressão hidrostática celular rearranjando a Equação 3.6 conforme segue: $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = (–0,244) — (–0,732) = 0,488 MPa.

A água também pode sair da célula em resposta a um gradiente de potencial hídrico

A água também pode sair da célula por osmose. Se, no exemplo anterior, a célula vegetal da solução 0,1 *M* de sacarose for removida e colocada em uma solução 0,3 *M* de sacarose (Figura 3.9D), o $\Psi_{w(solução)}$ (–0,732 MPa) será mais negativo que o $\Psi_{w(célula)}$ (–0,244 MPa) e a água mover-se-á da célula túrgida para a solução.

À medida que a água sai da célula, o volume celular decresce. À medida que o volume celular decresce, o Ψ_p e o Ψ_w celular também decrescem, até que $\Psi_{w(célula)} = \Psi_{w(solução)}$ = –0,732 MPa. A partir da equação do potencial hídrico (Equação 3.6), é possível calcular que, em equilíbrio, Ψ_p = 0 MPa. Como antes, assume-se que a mudança no volume celular é pequena, de forma que se pode ignorar a mudança em Ψ_s.

Se, então, lentamente a célula túrgida for comprimida, pressionando-a entre duas placas (Figura 3.9E), efetivamente aumenta-se o Ψ_p celular, aumentando-se conseqüentemente o Ψ_w celular e criando-se um $\Delta\Psi_w$, de forma que agora a água flui para *fora* da célula. Se se continuar comprimindo até que metade da água celular seja removida e então se mantiver a célula nessa condição, ela atingirá um novo equilíbrio. Como no exemplo anterior, em equilíbrio, $\Delta\Psi_w$ = 0 MPa e a quantidade de água adicionada à solução externa é tão pequena que pode ser ignorada. A célula retornará, então, ao valor de Ψ_w que tinha antes do procedimento de compressão. No entanto, os componentes do Ψ_w celular serão bem diferentes.

Uma vez que metade da água celular foi retirada da célula enquanto os solutos permaneceram dentro da mesma (a membrana plasmática é seletivamente permeável), a concentração da solução celular é duplicada e, assim, o Ψ_s é menor (–0,732 MPa × 2 = –1,464 MPa). Conhecendo os valores finais de Ψ_w e de Ψ_s, pode-se calcular a pressão de turgor usando a Equação 3.6, uma vez que $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$ = (–0,244) – (–1,464) = 1,22 MPa. No exemplo, usou-se uma força externa para se alterar o volume celular sem uma mudança no potencial hídrico. Na natureza, é tipicamente o ambiente celular que se altera e a célula ganha ou perde água, até que o seu Ψ_w iguale-se ao do meio circundante.

Um ponto comum em todos esses exemplos merece ênfase: *o fluxo de água é um processo passivo. Ou seja, a água move-se em resposta a forças físicas, em direção a regiões de baixo potencial hídrico ou de baixa energia livre.* Não há "bombas" metabólicas (reações governadas por hidrólise de ATP) que empurrem a água de um lugar para outro. Essa regra é válida desde que a água seja a única substância transportada. Quando solutos são transportados, entretanto, como ocorre para pequenas distâncias, através de membranas (ver Capítulo 6) e para grandes distâncias no floema (ver Capítulo 10), então o transporte de água pode ser associado ao de soluto, podendo tal associação mover a água contra um gradiente de potencial hídrico.

Por exemplo, o transporte de açúcares, de aminoácidos ou de outras moléculas pequenas por intermédio de várias proteínas de membrana pode "arrastar" até 260 moléculas de água pela membrana por molécula de soluto transportado (Loo e cols., 1996). Esse transporte de água pode ocorrer mesmo quando o movimento é contra o gradiente usual de potencial hídrico (i. é, em direção a um grande potencial hídrico), pois a perda de energia livre pelo soluto mais do que compensa o ganho de energia livre pela água. A mudança líquida na energia livre permanece negativa. No floema, o transporte em massa de solutos e de água dentro de tubos crivados ocorre ao longo de gradientes de pressão hidrostática (de turgor), em vez de por osmose. Assim, dentro do floema, a água pode ser transportada de regiões com menores potenciais hídricos (p. ex., folhas) para regiões com maiores potenciais hídricos (p. ex., raízes). *Apesar dessas situações, na grande maioria dos casos a água nas plantas move-se de maiores para menores potenciais hídricos.*

Pequenas mudanças no volume da célula vegetal causam grandes mudanças na pressão de turgor

As paredes celulares proporcionam às células vegetais um grau substancial de homeostase de volume em relação às grandes mudanças em potencial hídrico que elas sofrem, como conseqüência diária das perdas de água transpiratória associadas à fotossíntese (ver Capítulo 4). Uma vez que as células vegetais têm paredes bastante rígidas, uma mudança no Ψ_w celular é em geral acompanhada por uma grande mudança em Ψ_p, com relativamente pouca modificação no volume da célula (protoplasto).

Tal fenômeno é ilustrado nas relações de Ψ_w, Ψ_p e Ψ_s em função do volume celular relativo. No exemplo de uma célula hipotética mostrado na Figura 3.10, à medida que Ψ_w decresce de 0 para cerca de –2 MPa, o volume celular é reduzido em somente 5%. A

maior parte desse decréscimo* é devido a uma redução em Ψ_p (de cerca de 1,2 MPa); Ψ_s decresce cerca de 0,3 MPa como resultado da água perdida pela célula e conseqüente aumento na concentração dos solutos celulares. Compare isto com as mudanças em volume de uma célula sem parede.

Medidas de potencial hídrico celular e de volume celular (ver Figura 3.10) podem ser usadas para quantificar como as paredes celulares influenciam o *status* hídrico de células vegetais.

1. Pressão de turgor ($\Psi_p > 0$) existe somente quando as células estão relativamente bem hidratadas. Na maioria das células, a pressão de turgor aproxima-se de zero à medida que o volume celular decresce de 10 a 15%. Entretanto, para células com paredes celulares muito rígidas (p. ex., células do mesofilo em folhas de muitas palmeiras), a mudança em volume associada com a perda de turgor pode ser bem menor, enquanto que em células com paredes extremamente elásticas, como as de estocagem de água nos caules de muitas cactáceas, tal mudança de volume pode ser substancialmente maior.
2. A curva de Ψ_p da Figura 3.10 proporciona uma forma de medir a rigidez relativa da parede celular, simbolizada por ε (a letra grega épsilon): $\varepsilon = \Delta\Psi_p/\Delta$ (volume relativo). ε é a inclinação da curva de Ψ_p e não é constante, mas decresce à medida que a pressão de turgor é reduzida, porque paredes não-lignificadas de células vegetais são normalmente rígidas apenas quando a pressão de turgor coloca-as sob tensão. Tais células agem como bolas de basquete: a parede é rígida (tem alto ε) quando a bola está inflada, mas torna-se frouxa e colapsável ($\varepsilon = 0$) quando a bola perde pressão.
3. Quando ε e Ψ_p são pequenos, as mudanças no potencial hídrico são dominadas por mudanças em Ψ_s (observe como as curvas de Ψ_w e de Ψ_w convergem à medida que o volume celular aproxima-se de 85%).

FIGURA 3.10 Relação entre potencial hídrico celular (Ψ_w) e seus componentes (Ψ_p e Ψ_s) e o volume celular relativo ($\Delta V/V$). As curvas mostram que a pressão de turgor (Ψ_p) decresce pronunciadamente com o decréscimo inicial de 5% no volume celular. Em comparação, o potencial osmótico (Ψ_s) muda muito pouco. À medida que o volume celular decresce abaixo de 0,9 no exemplo, a situação se inverte: a maior parte da mudança no potencial hídrico é devida a uma queda no Ψ_s, acompanhada por relativamente pouca mudança na pressão de turgor. A inclinação da curva que ilustra a relação Ψ_p *versus* volume é uma medida do módulo de elasticidade celular (ε) (uma medida de rigidez de parede). Note que e não é constante, mas decresce à medida que a célula perde turgor (segundo Tyree e Jarvis, 1982, com base em um ramo de *Picea sitchensis*).

As taxas de transporte de água dependem da força propulsora e da condutividade hidráulica

Até agora, viu-se que a água move-se por intermédio de uma membrana em resposta a um gradiente de potencial hídrico. A direção do fluxo é determinada pela direção do gradiente de Ψ_w, e a taxa de movimento de água é proporcional à magnitude do gradiente propulsor. Entretanto, para uma célula que é exposta a uma alteração no potencial hídrico do meio circundante (p. ex., ver Figura 3.9), o movimento de água pela membrana celular vai diminuir com o tempo, à medida que os potenciais hídricos interno e externo convergem (Figura 3.11). A taxa aproxima-se de zero de forma exponencial (ver Dainty, 1976), com um meio-tempo (os meios-tempos caracterizam convenientemente processos que mudam exponencialmente com o tempo) dado pela seguinte equação:

$$t_{1/2} = \left(\frac{0{,}693}{(A)(Lp)}\right)\left(\frac{V}{\varepsilon - \Psi_s}\right) \quad (3.7)$$

onde V e A são, respectivamente, o volume e a superfície da célula, e L_p é a **condutividade hidráulica** da membrana celular. A condutividade hidráulica descreve o quão prontamente a água pode se mover por uma membrana e tem unidades de volume de água por unidade de área de membrana, por unidade de tempo, por unidade de força propulsora (i. é, $m^3\ m^{-2}\ s^{-1}\ MPa^{-1}$). Para discussão adicional sobre condutividade hidráulica, ver **Tópico 3.6 na Internet**.

Um meio-tempo curto significa equilíbrio rápido. Assim, células com uma grande razão de superfície: volume, alta condutividade hidráulica e paredes celulares rígidas (grande ε) atingirão rapidamente o equilíbrio com o meio circundante. Os meios-tempos celulares tipicamente variam de 1 a 10 s, embora alguns sejam muito mais curtos (Steudle, 1989). Esses baixos meios-tempos significam que células individuais atingem equilíbrio de potencial hídrico com o meio circundante em menos de 1 minuto. Para tecidos multicelulares, esses meios-tempos são muito maiores.

*N. de T. Esse decréscimo refere-se ao Ψ_w.

(A)

(B)

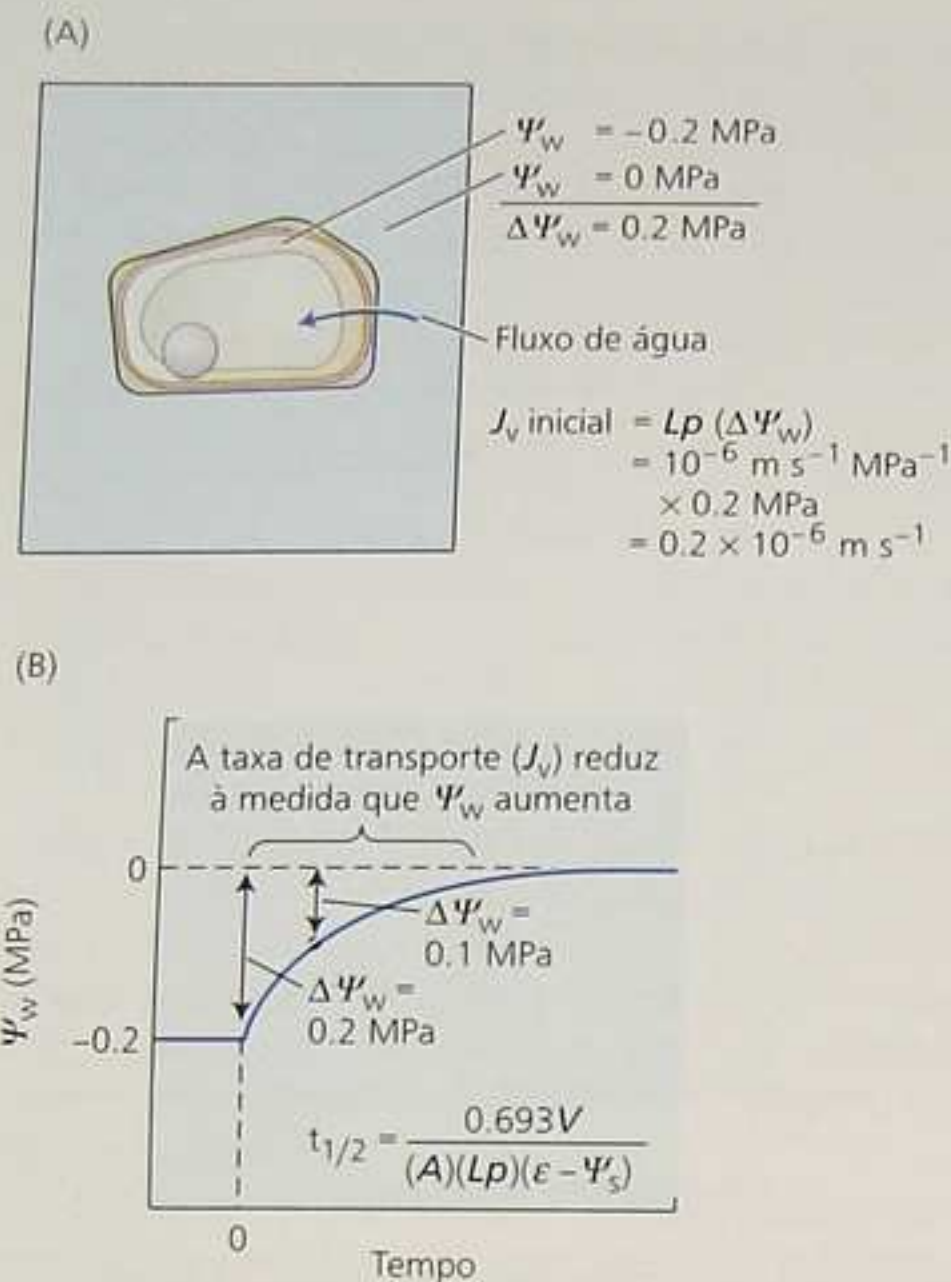



FIGURA 3.11 A taxa de transporte de água para dentro de uma célula depende da diferença de potencial hídrico ($\Delta\Psi_w$) e da condutividade hidráulica da membrana celular (L_p). No exemplo, (A) a diferença de potencial hídrico inicial é 0,2 MPa e L_p é 10^{-6} m s^{-1} MPa^{-1}. Esses valores geram uma taxa de transporte inicial (J_v) de $0{,}2 \times 10^{-6}$ m s^{-1}. (B) À medida que a água é absorvida pela célula, a diferença de potencial hídrico decresce com o tempo, levando a uma redução na taxa de absorção de água. Esse efeito segue curso temporal de queda exponencial com um meio-tempo ($t_{1/2}$) que depende dos seguintes parâmetros celulares: volume (V), área de superfície (A), L_p, módulo volumétrico de elasticidade (ε) e potencial osmótico celular (Ψ_s).

O conceito de potencial hídrico ajuda a avaliar o *status* hídrico de uma planta

O conceito de potencial hídrico tem dois usos principais: primeiro, o potencial hídrico governa o transporte através de membranas celulares, conforme foi descrito. Segundo, o potencial hídrico é comumente utilizado como uma medida do *status hídrico* de uma planta. Devido à perda de água transpiratória para a atmosfera, as plantas raramente estão com plena hidratação. Elas sofrem déficits hídricos que levam à inibição do crescimento vegetal e da fotossíntese, assim como a outros efeitos prejudiciais. A Figura 3.12 lista algumas das mudanças fisiológicas às quais as plantas se expõem à medida que secam.

O processo mais afetado pelo déficit hídrico é o crescimento celular. O estresse hídrico mais severo conduz à inibição da divisão celular, à inibição da síntese de proteínas e de parede, ao acúmulo de solutos, ao fechamento estomático e à inibição da fotossíntese. O potencial hídrico é uma medida do grau de hidratação de uma planta e, assim, fornece um índice relativo do *estresse hídrico* ao qual a planta está submetida (ver Capítulo 25).

A Figura 3.12 também mostra valores representativos de Ψ_w em vários estágios de estresse hídrico. Em folhas de plantas bem aguadas, Ψ_w varia de –0,2 até cerca de –1,0 MPa, mas as folhas de plantas em climas áridos podem ter valores muito mais baixos, talvez de –2 a –5 MPa sob condições extremas. Devido ao transporte de água ser um processo passivo, as plantas podem absorver água somente quando o Ψ_w das plantas é menor que o Ψ_w do solo. À medida que o solo torna-se mais seco, a planta, similarmente, torna-se menos hidratada (atinge um menor Ψ_w). Se esse não fosse o caso, o solo começaria a extrair água da planta.

FIGURA 3.12 Potencial hídrico de plantas sob várias condições de crescimento e sensibilidade de vários processos fisiológicos ao potencial hídrico. A intensidade da coloração da barra corresponde à magnitude do processo. Por exemplo, a expansão celular decresce à medida que o potencial hídrico cai (torna-se mais negativo). O ácido abscísico é um hormônio que induz o fechamento estomático durante o estresse hídrico (ver Capítulo 23) (Hsiao, 1979).

Os componentes do potencial hídrico variam com as condições de crescimento e localização dentro da planta

Da mesma forma que os valores de Ψ_w dependem das condições de crescimento e do tipo de planta, também os valores de Ψ_s podem variar consideravelmente. No interior de células de plantas bem-aguadas de uma horta (exemplos incluem alface, plântulas de pepino e folhas de feijão), o Ψ_s pode ser tão alto quanto –0,5 MPa, embora valores de –0,8 a –1,2 MPa sejam mais típicos. O limite superior do Ψ_s celular é provavelmente estabelecido pela concentração mínima de íons dissolvidos, metabólitos e proteínas do citoplasma de células vivas.

No outro extremo, plantas sob condições de seca muitas vezes atingem um Ψ_s bem mais baixo. Por exemplo, o estresse hídrico leva tipicamente a um acúmulo de solutos no citoplasma e no vacúolo, permitindo, assim, à planta a manutenção do turgor apesar dos baixos potenciais hídricos.

Tecidos vegetais que estocam grandes concentrações de sacarose ou outros açúcares, como raízes de beterraba, caules de cana-de-açúcar ou bagas de uva, também atingem baixos valores de Ψ_s. Valores tão baixos quanto –2,5 MPa não são incomuns. Plantas que crescem em ambientes salinos, chamadas halófitas, têm tipicamente valores muito baixos de Ψ_s. Um baixo valor reduz o Ψ_w celular o suficiente para permitir a extração de água da água salina, sem permitir que níveis excessivos de sais entrem ao mesmo tempo. A maioria das plantas cultivadas não pode sobreviver na água do mar, a qual, devido aos sais dissolvidos, tem um potencial hídrico menor que aquele que os tecidos vegetais podem atingir sem afetar a competência funcional dos mesmos.

Apesar de o Ψ_s dentro das células poder ser muito negativo, a solução apoplástica que circunda as células — ou seja, nas paredes celulares e no xilema — pode conter somente baixas concentrações de solutos. Assim, o Ψ_s nessa fase da planta é tipicamente muito mais alto — por exemplo, –0,1 a 0 MPa. Potenciais hídricos negativos no xilema e nas paredes celulares são normalmente devidos a Ψ_p negativos. Valores de Ψ_p dentro de células de plantas hortícolas bem-aguadas podem variar de 0,1 a talvez 1 MPa, dependendo do valor de Ψ_s dentro da célula.

Uma pressão de turgor (Ψ_p) positiva é importante por duas razões. Primeiro, o crescimento de células vegetais requer pressão de turgor para distender as paredes celulares. A perda de Ψ_p sob déficits hídricos pode explicar, em parte, por que o crescimento celular é tão sensível ao estresse hídrico (ver Capítulo 25). A segunda razão pela qual um turgor positivo é importante está no fato de que a pressão de turgor aumenta a rigidez mecânica de células e tecidos. Essa função da pressão de turgor celular é particularmente importante para tecidos jovens, não-lignificados, os quais não podem se sustentar mecanicamente sem uma alta pressão interna. Uma planta **murcha** (torna-se flácida), quando a pressão de turgor dentro das células de seus tecidos cai em direção a zero. O **Tópico 3.7na Internet** discute plasmólise, encolhimento do protoplasto para longe da parede celular, o qual ocorre quando células em solução perdem água.

Enquanto a solução dentro da célula pode ter um Ψ_p grande e positivo, a água fora da célula pode ter valores negativos de Ψ_p. No xilema de plantas que transpiram rapidamente, o Ψ_p é negativo e pode atingir valores de –1 MPa ou menores. A magnitude de Ψ_p nas parede celulares e no xilema varia consideravelmente, dependendo da taxa de transpiração e da altura da planta. No meio do dia, quando a transpiração é máxima, o Ψ_p do xilema atinge seus valores menores, mais negativos. À noite, quando a transpiração é baixa e a planta se reidrata, ele tende a aumentar.

RESUMO

A água é importante para a vida das plantas porque ela constitui a matriz e o meio onde ocorre a maioria dos processos bioquímicos essenciais à vida. A estrutura e as propriedades da água influenciam profundamente a estrutura e as propriedades das proteínas, das membranas, dos ácidos nucléicos e de outros constituintes celulares.

Na maioria das plantas terrestres, a água é continuamente perdida para a atmosfera e absorvida do solo. O movimento da água é governado por uma redução em energia livre e a água pode se mover por difusão, por transporte em massa ou por uma combinação destes mecanismos fundamentais de transporte. A água difunde-se porque as moléculas estão em constante agitação térmica, o que tende a eliminar as diferenças de concentração. A água move-se por transporte em massa em resposta a uma diferença de pressão, sempre que há uma rota apropriada para movimento em massa da água. A osmose, o movimento de água pelas membranas, depende de um gradiente de energia livre da água pela membrana — um gradiente normalmente medido como uma diferença de potencial hídrico.

Concentração de soluto e pressão hidrostática são dois principais fatores que afetam o potencial hídrico, embora, quando distâncias verticais grandes estão envolvidas, a gravidade também é importante. Tais componentes do potencial hídrico podem ser somados como segue: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p + \Psi_g$. As células vegetais atingem equilíbrio de potencial hídrico com o ambiente local das mesmas absorvendo ou perdendo água. Normalmente, tal mudança no volume celular resulta em uma mudança no Ψ_p celular, acompanhada por mudanças mínimas no Ψ_s celular. A taxa de transporte de água através de uma membrana depende da diferença de potencial hídrico através dessa membrana e da condutividade hidráulica da mesma.

Além de sua importância no transporte, o potencial hídrico é uma medida útil do *status* hídrico das plantas. Conforme será visto no Capítulo 4, a difusão, o transporte em massa e a osmose, todos ajudam a mover a água do solo, através da planta, para a atmosfera.

Material da Internet

Tópicos da Internet

3.1 Calculando a ascensão capilar
A quantificação da ascensão capilar permite a avaliação do papel funcional da ascensão capilar no movimento de água nas plantas

3.2 Calculando meios-tempos de difusão
A avaliação do tempo necessário para uma molécula como a glicose se difundir através de células, tecidos e órgãos mostra que a difusão tem relevância fisiológica apenas ao longo de curtas distâncias.

3.3 Convenções alternativas para componentes do potencial hídrico
Os fisiologistas vegetais desenvolveram várias convenções para definir o potencial hídrico em plantas. Uma comparação das principais definições em alguns desses sistemas de convenção proporciona um melhor entendimento da literatura de relações hídricas.

3.4 Potencial mátrico
Uma breve discussão do conceito de potencial mátrico, usado para quantificar o potencial químico da água em solos, sementes e paredes celulares.

3.5 Medindo o potencial hídrico
Uma descrição detalhada dos métodos disponíveis para medição do potencial hídrico em células e tecidos vegetais.

3.6 Entendendo a condutividade hidráulica
Condutividade hidráulica, uma medida da permeabilidade da membrana à água, é um dos fatores que determinam a velocidade do movimento da água nas plantas.

3.7 Murcha e plasmólise
A plasmólise é uma grande mudança estrutural* resultante de uma grande perda de água por osmose.

Referências bibliográficas

Dainty, J. (1976) Water relations of plant cells. In *Transport in Plants*, Vol. 2, Part A: *Cells* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 2.), U. Lüttge and M. G. Pitman, eds., Springer, Berlin, pp. 12-35.

Finkelstein, A. (1987) *Water Movement through Lipid Bilayers, Pores, and Plasma Membranes: Theory and Reality*. Wiley New York.

Friedman, M. H. (1986) *Principles and Models of Biological Transport*. Springer Verlag, Berlin.

Hsiao, T. C. (1979) Plant responses to water deficits, efficiency, and drought resistance. *Agricult. Meteorol.* 14: 59-84.

Loo, D. D. F., Zeuthen, T., Chandy G., and Wright, E. M. (1996) Cotransport of water by the Na+/glucose cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13367-13370.

Nobel, P S. (1999) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Schäffner, A. R. (1998) Aquaporin function, structure, and expression: Are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204:131-139.

Stein, W D. (1986) *Transport and Diffusion across Cell Membranes*. Academic Press, Orlando, FL.

Steudle, E. (1989) Water flow in plants and its coupling to other processes: An overview. *Methods Enzymol.* 174: 183-225.

Tajkhorshid, E., Nollert, P., Jensen, M. O., Miercke, L. H. W, O'Connell, J., Stroud, R. M., and Schulten, K. (2002) Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientation tuning. *Science* 296: 525-530.

Tyerman, S. D., Bohnert, H. J., Maurel, C., Steudle, E., and Smith, J. A. C. (1999) Plant aquaporins: Their molecular biology, biophysics and significance for plant-water relations. *J. Exp. Bot.* 50: 1055-1071.

Tyree, M. T., and Jarvis, P G. (1982) Water in tissues and cells. In *Physiological Plant Ecology, Vol. 2: Water Relations and Carbon Assimilation* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 12B), O. L. Lange, P S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Ziegler, eds., Springer, Berlin, pp. 35-77.

Weather and Our Food Supply (CAED Report 20). (1964) Center for Agricultural and Economic Development, Iowa State University of Science and Technology, Ames, IA.

Weig, A., Deswarte, C., and Chrispeels, M. J. (1997) The major intrinsic protein family of *Arabidopsis* has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group. *Plant Physiol.* 114: 1347-1357.

Whittaker R. H. (1970) *Communities and Ecosystems*. Macmillan, New York.

*N. de T. Esta mudança estrutural refere-se à célula vegetal.

Capítulo

4 Balanço hídrico das plantas

A VIDA NA ATMOSFERA DA TERRA apresenta um formidável desafio para as plantas. Por um lado, a atmosfera é a fonte de dióxido de carbono, necessário para a fotossíntese. As plantas, portanto, precisam de pronto acesso à atmosfera. Por outro lado, a atmosfera é relativamente seca e pode desidratar a planta. Para satisfazer as demandas contraditórias de maximizar a absorção de dióxido de carbono enquanto limitam a perda de água, as plantas desenvolveram adaptações para controlar a perda de água das folhas e repor a água perdida para a atmosfera.

Neste capítulo, serão examinados os mecanismos e as forças propulsoras que operam no transporte de água dentro da planta e entre a planta e seu ambiente. A perda de água por transpiração pelas folhas é controlada por um gradiente de concentração de vapor de água. O transporte de longa distância no xilema é governado por gradientes de pressão, da mesma forma que o movimento de água no solo. O transporte de água pelas camadas celulares, como as do córtex radicular (ver Glossário), é complexo, mas responde a gradientes de potencial hídrico ao longo do tecido.

Ao longo de toda essa jornada, o movimento de água é passivo, no sentido de que a energia livre da água diminui à medida que ela se move. Apesar de sua natureza passiva, o transporte de água é perfeitamente regulado pela planta para minimizar a desidratação, principalmente pela regulação da transpiração para a atmosfera. Este exame do transporte de água será iniciado, dando-se enfoque à água no solo.

A ÁGUA NO SOLO

O conteúdo de água e a sua taxa de movimento no solo dependem em grande parte do tipo e da estrutura do solo. A Tabela 4.1 mostra que as características físicas de solos diferentes podem variar significantemente. Em um extremo está a areia, onde o diâmetro das partículas de solo pode medir 1 mm ou mais. Solos arenosos têm uma área de superfície por unidade de grama de solo relativamente pequena e grandes espaços ou canais entre as partículas.

No outro extremo está a argila, onde as partículas são menores do que de 2 mm em diâmetro. Solos argilosos têm áreas de superfície muito maiores e canais menores entre as partículas. Com o auxílio de substâncias orgânicas como o húmus (matéria orgânica em decomposição), partículas de argila podem agre-

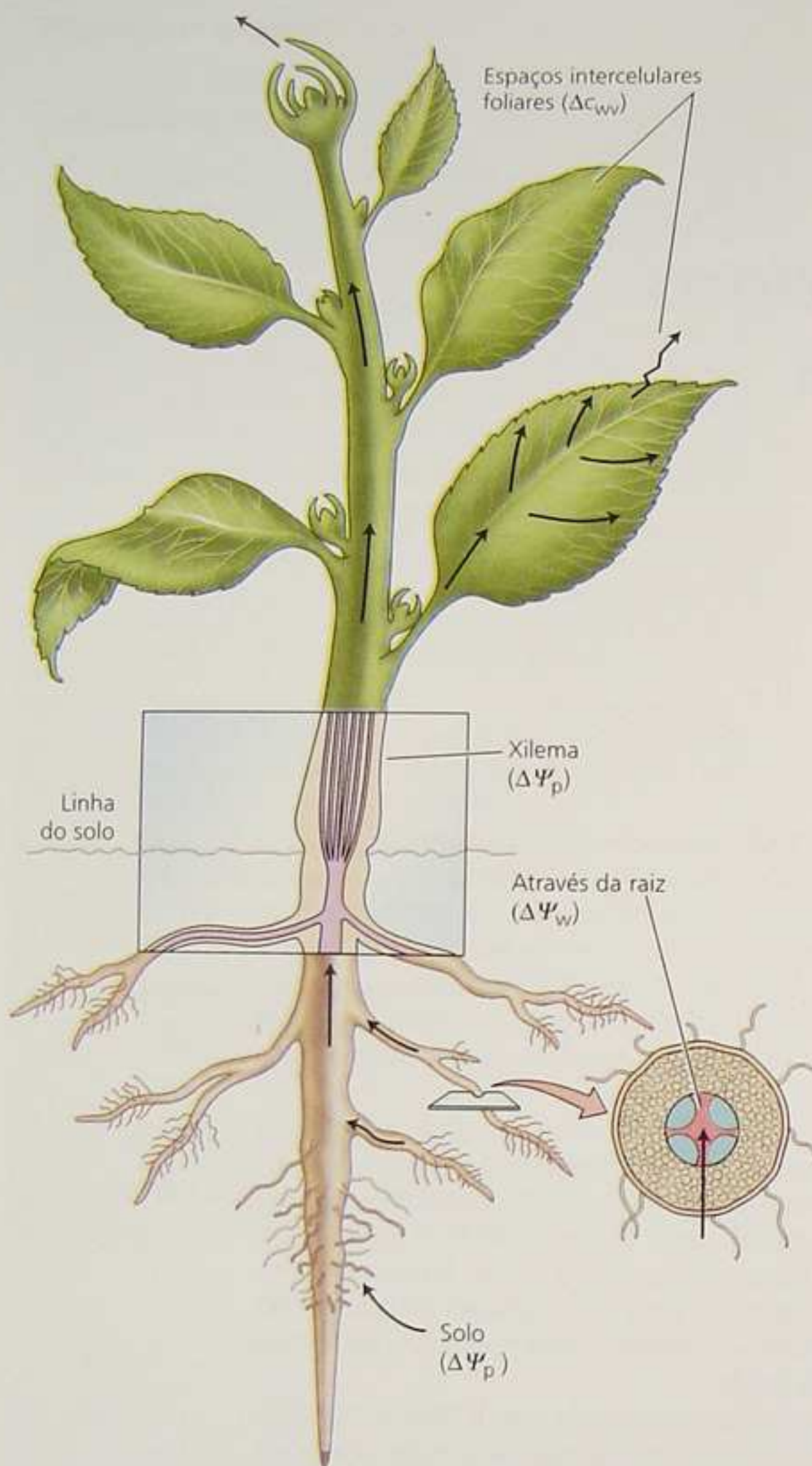



FIGURA 4.1 Principais forças propulsoras do movimento de água do solo através da planta para a atmosfera: diferenças em concentração de vapor de água (Δc_{wv}), pressão hidrostática ($\Delta \Psi_p$) e potencial hídrico ($\Delta \Psi_w$).

TABELA 4.1
Características físicas de diferentes solos

Solo	Diâmetro da partícula (mm)	Área de superfície por grama (m²)
Areia grossa	2.000–200	< 1–100
Areia fina	200–20	
Silte	20–2	10–100
Argila	< 2	100–1.000

gar-se em "torrões", que ajudam a melhorar a aeração e a infiltração de água do solo.

Quando um solo é pesadamente aguado por chuva ou irrigação, a água infiltra-se para baixo por gravidade através dos espaços entre as partículas de solo, parcialmente deslocando e, em alguns casos, aprisionando ar nesses canais. A água no solo pode existir como uma lâmina que se adere à superfície das partículas de solo ou pode preencher todo o canal entre as partículas.

Em solos arenosos, os espaços entre as partículas são tão grandes que a água tende a drenar dos mesmos e permanecer somente nas superfícies das partículas ou nos interstícios entre essas partículas. Em solos argilosos, os canais são pequenos o suficiente para que a água não drene livremente dos mesmos; ela é retida mais firmemente (ver **Tópico 4.1 da Internet**). A capacidade de retenção de umidade dos solos é chamada de **capacidade de campo**. A capacidade de campo é o conteúdo de água de um solo depois de ter sido saturado com água e de permitida a drenagem do excesso de água. Os solos argilosos ou aqueles com alto conteúdo de húmus têm grande capacidade de campo. Poucos dias após terem sido saturados, eles podem reter 40% da água por unidade de volume. Por outro lado, os solos arenosos tipicamente retêm 3% de água por volume depois da saturação.

Nas seções seguintes, examinaremos como a pressão negativa da água do solo altera o seu potencial hídrico, como a água movimenta-se no solo e como as raízes absorvem a água necessária às plantas.

Uma pressão hidrostática negativa na água do solo diminui o potencial hídrico do solo

Da mesma forma que o potencial hídrico nas células vegetais, o potencial hídrico dos solos pode ser decomposto em dois componentes, o potencial osmótico e a pressão hidrostática. O potencial osmótico (Ψ_s; ver o Capítulo 3) da água do solo é geralmente desprezível, pois as concentrações de soluto são baixas; um valor típico pode ser –0,02 MPa. Para solos que contêm uma concentração substancial de sais, no entanto, Ψ_s é significante, talvez –0,2 MPa ou menor.

O segundo componente do potencial hídrico é a pressão hidrostática (Ψ_p) (Figura 4.1). Para solos úmidos, Ψ_p é muito próximo de zero. À medida que o solo seca, Ψ_p decresce e pode tornar-se muito negativo. De onde vem a pressão negativa da água do solo?

Lembre-se da discussão sobre capilaridade no Capítulo 3, que a água tem uma alta tensão superficial que tende a minimizar as interfaces ar-água. À medida que o solo seca, a água é, primeiro, removida do centro dos maiores espaços entre as partículas. Por causa das forças de adesão, a água tende a se prender às superfícies das partículas de solo, de forma que uma grande área de superfície entre a água do solo e o ar do solo se desenvolve (Figura 4.2).

À medida que o conteúdo de água do solo decresce, a água retrocede para os interstícios entre partículas do solo e a superfície ar-água desenvolve interfaces ar-água curvas. A água sob tais superfícies curvas desenvolve uma pressão negativa, que pode ser estimada pela seguinte fórmula:

$$\Psi_\pi = \frac{-2T}{r} \quad (4.1)$$

onde T é a tensão superficial da água ($7{,}28 \times 10^{-8}$ MPa m) e r é o raio de curvatura da interface ar-água.

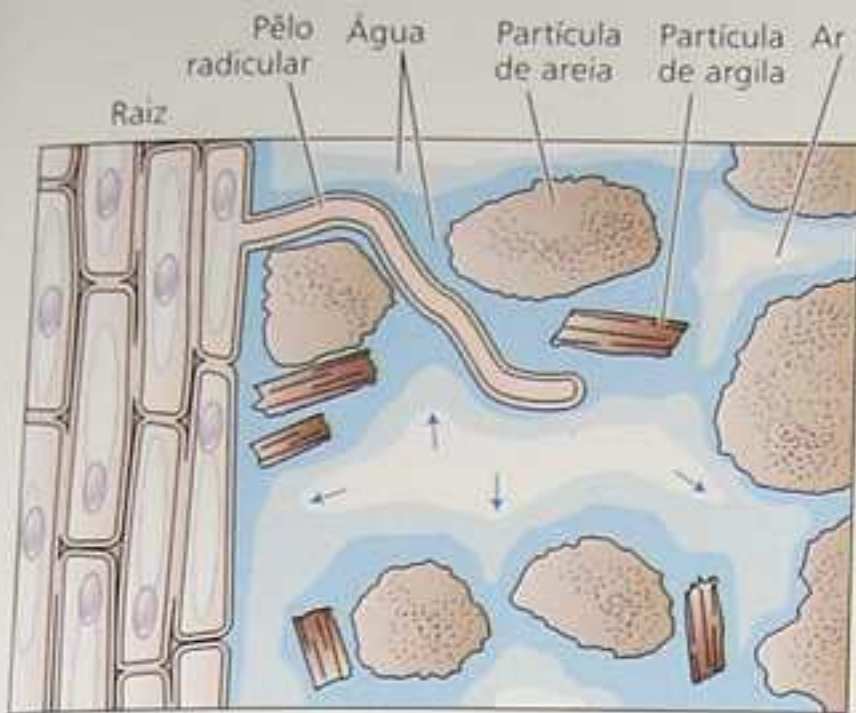



FIGURA 4.2 Pêlos radiculares fazem um contato íntimo com as partículas do solo e amplificam grandemente a área de superfície que pode ser utilizada para a absorção de água pela planta. O solo é uma mistura de partículas (areia, argila, limo e material orgânico), água, solutos dissolvidos e ar. A água é adsorvida à superfície das partículas do solo. À medida que a água é absorvida pela planta, a solução do solo retrocede para pequenos compartimentos, canais e fissuras entre as partículas do solo. Nas interfaces ar-água, esse recuo faz com que a superfície da solução do solo desenvolva um menisco côncavo (interfaces curvas entre ar e água, marcadas na figuras por flechas), desenvolvendo uma tensão (pressão negativa) na solução por meio da tensão superficial. À medida que mais água é removida do solo, meniscos mais agudos são formados, resultando em tensões maiores (pressões mais negativas).

O valor de Ψ_p na água do solo pode ser muito negativo porque os raios de curvatura das superfícies ar-água podem tornar-se muito pequenos em solos que estão secando. Por exemplo, uma curvatura com r = 1 μm (mais ou menos o tamanho das maiores partículas de argila) corresponde a um valor de Ψ_p de –0,15 MPa. O valor de Ψ_p pode atingir facilmente de –1 a –2 MPa à medida que a interface ar-água recua para as fissuras menores, entre as partículas de argila.

Os cientistas do solo comumente descrevem o potencial hídrico do solo em termos de um potencial mátrico (Jensen e cols., 1998). Para discussão da relação entre potencial mátrico e potencial hídrico, ver o **Tópico 3.3 da Internet**.

A água se move através do solo por fluxo de massa

A água se move através dos solos predominantemente por fluxo de massa, governado por um gradiente de pressão. Além disso, a difusão de vapor de água contabiliza uma certa fração do movimento de água. À medida que as plantas absorvem água do solo, elas esgotam o solo de água junto à superfície das raízes. Esse esgotamento reduz o Ψ_p da água próxima à superfície radicular e estabelece um gradiente de pressão em relação às regiões vizinhas do solo, que possuem valores maiores de Ψ_p. *Uma vez que os espaços porosos preenchidos com água interconectam-se no solo, a água move-se em direção à superfície radicular por fluxo de massa através destes canais, obedecendo a um gradiente de pressão.*

A taxa de fluxo de água nos solo depende de dois fatores: do tamanho do gradiente de pressão através do solo e da condutividade hidráulica do solo. **A condutividade hidráulica do solo** é uma medida da facilidade com que a água se move pelo solo e varia com o tipo de solo e com o conteúdo de água. Solos arenosos, com grandes espaços entre as partículas, têm uma alta condutividade hidráulica, enquanto solos argilosos, com espaços diminutos entre suas partículas, têm uma condutividade hidráulica apreciavelmente menor.

À medida que o conteúdo de água (e, por conseqüência, o potencial hídrico) de um solo decresce, sua condutividade hidráulica diminui drasticamente (ver **Tópico 4.2 da Internet**). Esse decréscimo na condutividade hidráulica do solo deve-se principalmente à substituição da água nos espaços do solo por ar. Quando o ar se desloca para dentro de um canal do solo previamente preenchido por água, o movimento de água através daquele canal restringe-se à periferia do mesmo. À medida que mais espaços do solo são preenchidos por ar, a água pode deslocar-se por canais menos numerosos e menores, e a condutividade hidráulica cai.

Em solos muito secos, o potencial hídrico (Ψ_w) pode cair abaixo do que se chama **ponto de murcha permanente.** Nesse ponto, o potencial hídrico do solo é tão baixo que as plantas não podem recuperar a pressão de turgor, mesmo que toda a perda de água por transpiração cesse, significando que o potencial hídrico do solo (Ψ_w) é menor que ou igual ao potencial osmótico (Ψ_s) da planta. Uma vez que o Ψ_s da célula varia com a espécie vegetal, o ponto de murcha permanente claramente não é uma propriedade única do solo; ele depende também da espécie vegetal*.

ABSORÇÃO DE ÁGUA PELAS RAÍZES

Um contato íntimo entre a superfície radicular e o solo é essencial para a absorção efetiva de água pelas raízes. Esse contato proporciona a área de superfície necessária para a absorção de água** e é maximizado pelo crescimento das raízes e dos pêlos radiculares no solo. **Pêlos radiculares** são extensões microscópicas das células da epiderme radicular, que aumentam significativamente a área de superfície radicular, proporcionando, assim, maior capacidade para absorção de íons e água do solo. Quando plantas de centeio (*Secale*) de quatro meses de idade foram examinadas, verificou-se que os pêlos radiculares constituíam mais do que 60% da área de superfície das raízes (ver Figura 5.6).

A água penetra na raiz mais prontamente na porção apical radicular, que inclui a zona de pêlos radiculares. As regiões mais maduras da raiz normalmente têm uma camada mais externa de tecido de proteção denominada *exoderme* ou *hipoderme*, a qual contém material hidrofóbico em suas paredes e é relativamente impermeável à agua.

*N. de T. Além de depender da espécie, também depende das condições ambientais às quais as plantas são expostas. Por exemplo, uma exposição à seca ou à salinidade leva tipicamente a um acúmulo de solutos nas células da planta (ajuste osmótico), alterando o Ψ_s e, conseqüentemente, o ponto de murcha permanente.

**N. de T. Este contato reduz a chamada resistência da interface solo-raiz à passagem de água e permite uma melhor absorção de água pela área de superfície radicular presente.

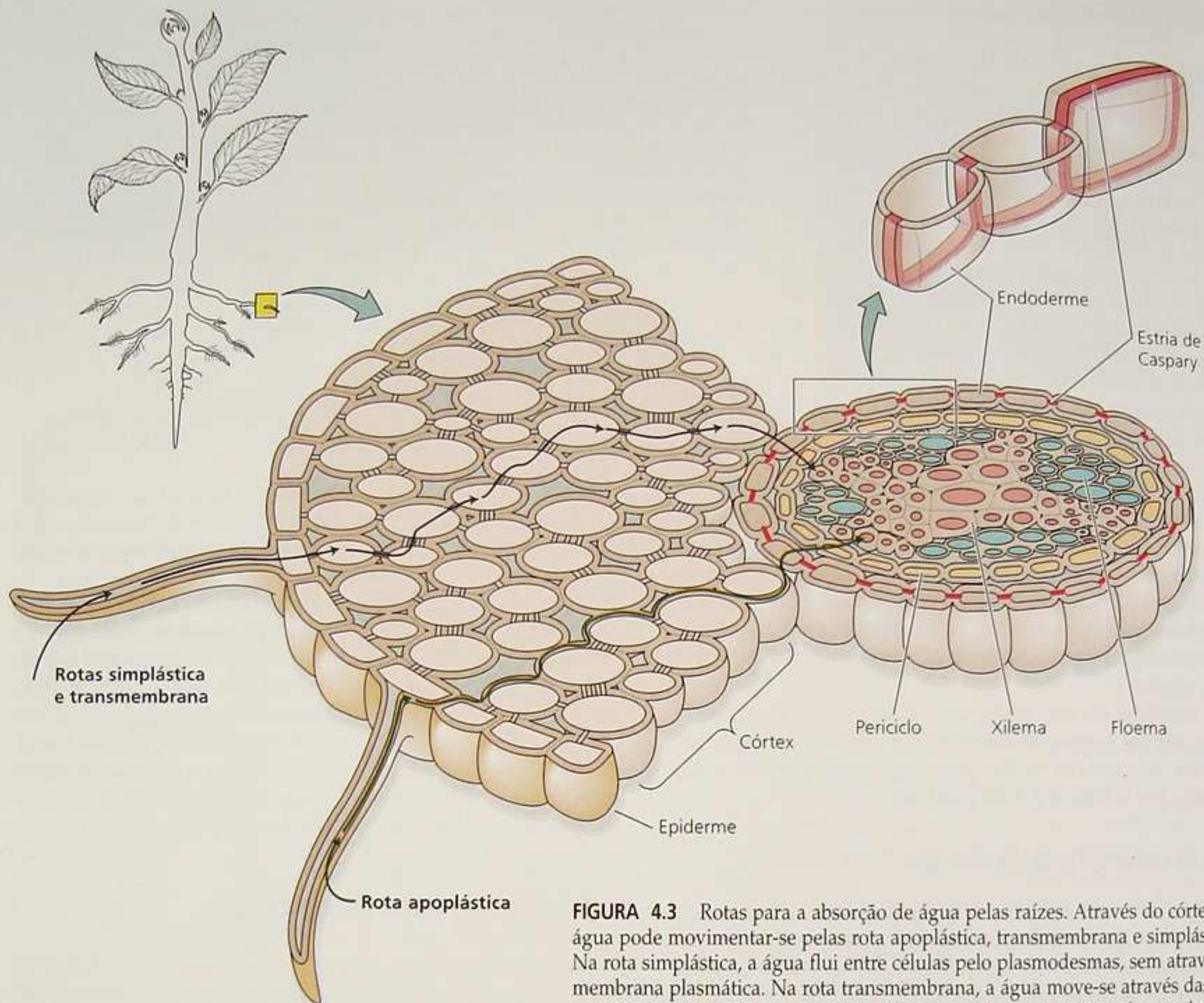



FIGURA 4.3 Rotas para a absorção de água pelas raízes. Através do córtex, a água pode movimentar-se pelas rota apoplástica, transmembrana e simplástica. Na rota simplástica, a água flui entre células pelo plasmodesmas, sem atravessar a membrana plasmática. Na rota transmembrana, a água move-se através das membranas plasmáticas, com uma curta permanência no espaço da parede celular. Na endoderme, a rota apoplástica é bloqueada pela estria de Caspary.

O contato íntimo entre o solo e a superfície radicular é facilmente rompido quando o solo é perturbado, razão pela qual as plantas e as plântulas recentemente transplantadas precisam ser protegidas da perda de água durante os primeiros dias após o transplante. A partir daí, o novo crescimento radicular no solo restabelece o contato solo-raiz e a planta pode suportar melhor o estresse hídrico.

Será considerado, agora, como a água se move dentro da raiz e os fatores que determinam a sua taxa de absorção por esse órgão.

A água se move na raiz pelas rotas apoplástica, transmembrana e simplástica

No solo, a água é transportada predominantemente por transporte de massa. Entretanto, quando ela entra em contato com a superfície radicular, a natureza de seu do transporte torna-se mais complexa. Da epiderme até a endoderme da raiz, existem três rotas pelas quais a água pode fluir (Figura 4.3): a apoplástica, a transmembrana e a simplástica.

1. Na rota apoplástica, a água move-se exclusivamente pela parede celular sem atravessar qualquer membrana. O apoplasto é o sistema contínuo de paredes celulares e espaços intercelulares nos tecidos vegetais.
2. A rota transmembrana é aquela seguida pela água que seqüencialmente entra em uma célula por um lado, sai pelo outro lado, entra na próxima célula da série e assim por diante. Nessa rota, a água atravessa pelo menos duas membranas para cada célula (a membrana plasmática na entrada e na saída). O transporte pelo tonoplasto também pode estar envolvido.
3. Na rota simplástica, a água movimenta-se de uma célula a outra através dos plasmodesmas (ver Capítulo 1). O simplasto consiste da rede de citoplasmas celulares interconectados por plasmodesmas.

Apesar da importância relativa das rotas apoplástica, transmembrana e simplástica não ter sido ainda completamente estabelecida, experimentos com a técnica da sonda de pressão (ver **Tópico 3.6 da Internet**) indicam que a rota apoplástica é particularmente importante para a absorção de água pelas raízes jovens de milho (French e cols., 1996; Steudle e Frensch, 1996).

Na endoderme, o movimento de água através do apoplasto é obstruído pela **estria de Caspary** (ver Figura 4.3), que é uma banda de paredes celulares radiais na endoderme, impregnada com uma substância cerosa e hidrofóbica, a **suberina**. A suberina atua como uma barreira ao movimento de água e soluto. A endoderme torna-se suberizada na porção da raiz que não está em crescimento, a vários milímetros do ápice radicular, mais ou menos no mesmo tempo em que os primeiros elementos do protoxilema amadurecem (Esau, 1953). A estria de Caspary quebra a continuidade da rota apoplástica e força a água e os solutos a cruzarem a endoderme pela membrana plasmática. Assim, apesar da importância da rota apoplástica no córtex radicular e no estelo, o movimento de água através da endoderme ocorre pelo simplasto.

Uma outra forma de entender o movimento de água através da raiz é considerá-la como uma rota única, tendo uma única condutância hidráulica. Tal abordagem levou ao desenvolvimento do conceito de **condutância hidráulica radicular** (ver **Tópico 4.3 da Internet**, para detalhes).

A região apical da raiz é mais permeável à água. Além deste ponto, a exoderme torna-se suberizada, limitando a absorção de água (Figura 4.4). Entretanto, alguma absorção de água pode acontecer por meio das raízes mais velhas, talvez através de fissuras no córtex associadas com a emissão de raízes secundárias.

A absorção de água decresce quando as raízes são submetidas a baixas temperaturas ou condições anaeróbicas ou tratadas com inibidores respiratórios (como cianeto). Esses tratamentos inibem a respiração radicular e as raízes transportam menos água. A explicação exata para tal efeito ainda não está clara. Por outro lado, o decréscimo no transporte de água nas raízes proporciona uma explicação para a murcha de plantas em solos encharcados: raízes submersas logo ficam sem oxigênio, o qual é normalmente provido pela difusão no espaço de ar no solo (difusão através de gás é 10^4 vezes mais rápida que difusão pela água). As raízes anaeróbicas transportam menos água para as partes aéreas, as quais, conseqüentemente sofrem uma perda líquida de água e começam a murchar.

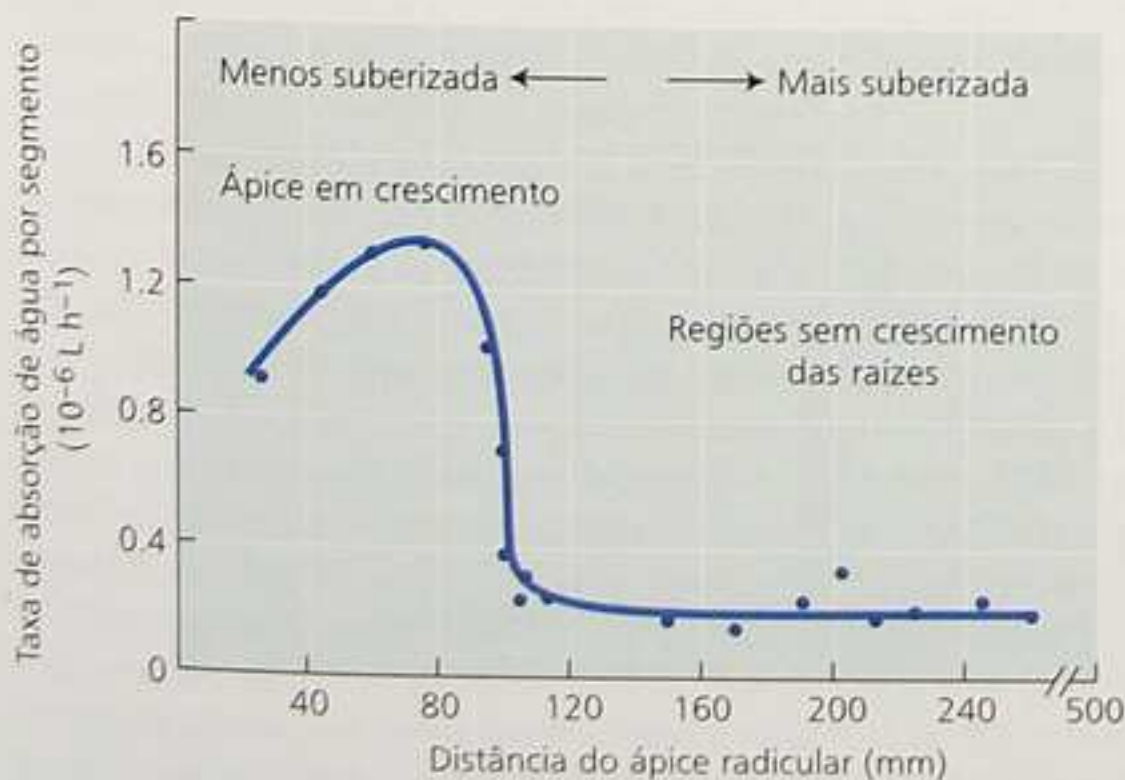



FIGURA 4.4 Taxa de absorção de água em várias posições ao longo de uma raiz de abóbora (Kramer e Boyer, 1995).

O acúmulo de solutos no xilema pode gerar "pressão de raiz"

Às vezes, as plantas exibem um fenômeno referido com **pressão de raiz.** Por exemplo, se o caule de uma plântula é secionado logo acima do solo, o coto normalmente exsudará seiva do xilema cortado por muitas horas. Se um manômetro é selado sobre o coto, pressões positivas podem ser medidas. Tais pressões podem ser tão altas quanto 0,05 a 0,5 MPa.

As raízes geram pressão hidrostática positiva absorvendo íons da solução diluída do solo e os transportando para o xilema. O acúmulo de solutos na seiva do xilema leva a um decréscimo no potencial osmótico (Ψ_s) do xilema e, portanto, a um decréscimo no potencial hídrico (Ψ_w) do mesmo. Essa diminuição do Ψ_w do xilema proporciona a força propulsora para a absorção de água, que, por sua vez, gera uma pressão hidrostática positiva nesse. De fato, toda a raiz atua como uma célula osmótica; o tecido radicular multicelular comporta-se como uma membrana osmótica, acumulando uma pressão hidrostática positiva no xilema em resposta ao acúmulo de solutos.

A pressão de raiz é mais provável de ocorrer quando os potenciais hídricos do solo são altos e as taxas de transpiração são baixas. Quando as taxas de transpiração são altas, a água é tão rapidamente absorvida pelas folhas e perdida para a atmosfera que uma pressão positiva nunca se desenvolve no xilema.

As plantas que desenvolvem pressão de raiz freqüentemente produzem gotículas líquidas nas margens de suas folhas, um fenômeno conhecido como **gutação** (Figura 4.5). Pressão positiva no

FIGURA 4.5 Gutação em folhas de morangueiro (*Fragaria grandiflora*). De manhã cedo, as folhas secretam gotículas de água pelos hidatódios, localizados nas margens das folhas. Flores jovens também podem exibir gutação (fotografia cedida por R. Aloni).

xilema provoca exsudação da seiva do xilema pelos poros especializados chamados *hidatódios*, que estão associados às terminações de nervuras na margem da folha. As "gotas de orvalho" que podem ser vistas nos ápices de folhas de gramíneas pela manhã são, na verdade, gotículas de gutação exsudadas desses poros especializados. A gutação é mais evidente quando a transpiração é suprimida e a umidade relativa é alta, como ocorre durante a noite.

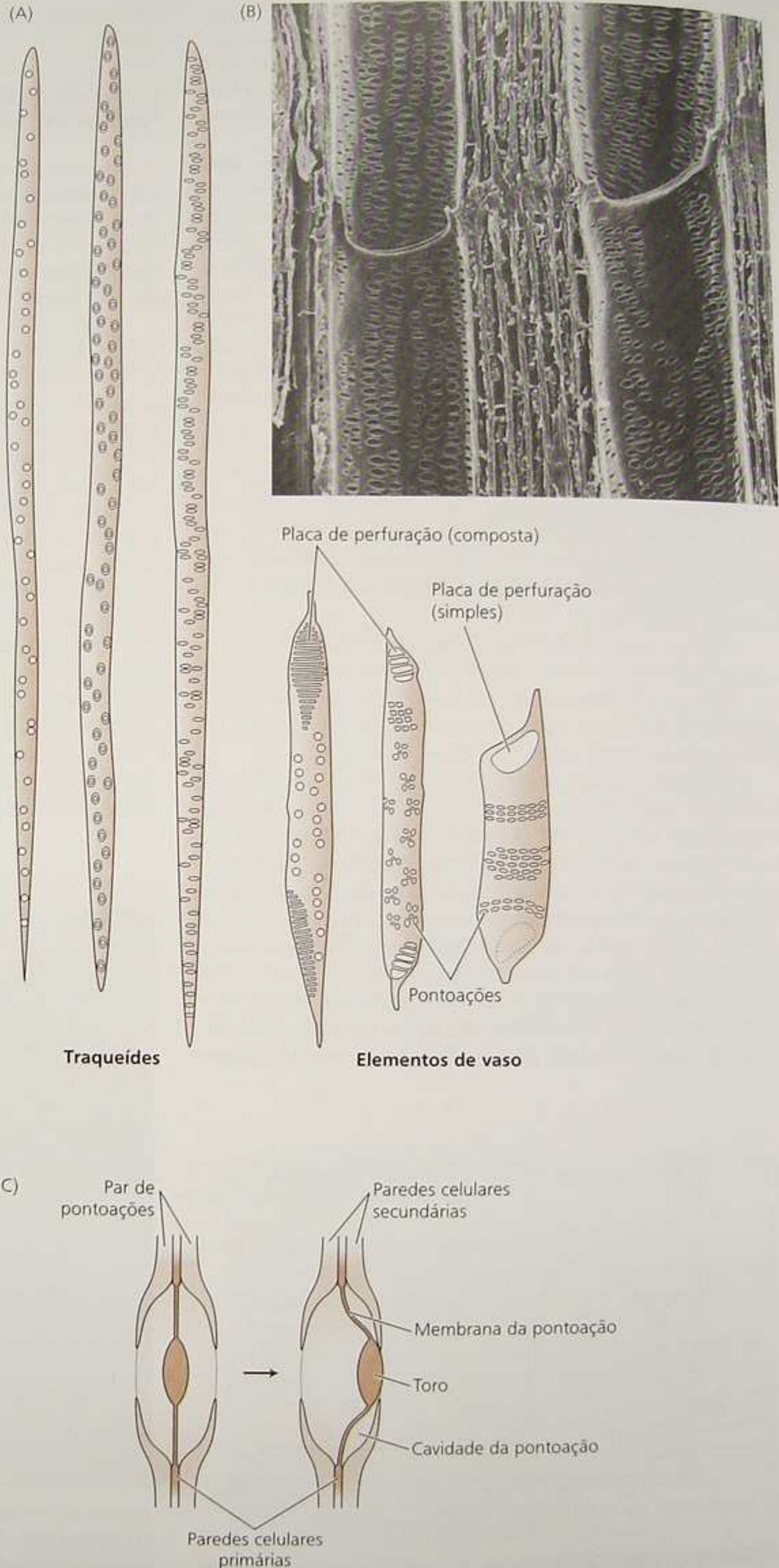
TRANSPORTE DE ÁGUA ATRAVÉS DO XILEMA

Na maioria das plantas, o xilema constitui a porção mais longa da rota de transporte de água. Em uma planta de 1 m de altura, mais de 99,5% da rota de transporte de água na planta encontra-se dentro do xilema; em árvores altas, o xilema representa uma fração ainda maior da rota. Comparada à rota complexa através da raiz, o xilema é uma rota simples, de baixa resistência. Nas seções que seguem, examinaremos como o movimento de água pelo xilema é otimamente ajustado para carregar a água das raízes às folhas e como a pressão hidrostática negativa gerada pela transpiração foliar puxa a água através do xilema.

O xilema consiste de dois tipos de elementos traqueais

As células condutoras no xilema têm uma anatomia especializada que lhes permite transportar grandes quantidades de água com grande eficiência. Existem dois tipos importantes de **elementos traqueais** no xilema: traqueídes e elementos de vaso (Figura 4.6). Elementos de vaso são encontrados somente em angiospermas, em um pequeno grupo de gimnospermas chamado *Gnetales* e, talvez, em algumas pteridófitas. Traqueídes estão presentes tanto em angiospermas quanto em gimnospermas, assim como em pteridófitas e outros grupos de plantas vasculares.

A maturação tanto de traqueídes quanto de elementos de vaso envolve a "morte" da célula. Assim, células condutoras de água funcionais não têm membranas e organelas. O que permanece são paredes celulares lignificadas e grossas, que formam tubos ocos através dos quais a água pode fluir com resistência relativamente baixa.

Traqueídes são células fusiformes alongadas (Figura 4.6A) organizadas em filas ver-

◀ **FIGURA 4.6** Elementos traqueais e suas interconexões. (A) Comparação estrutural de traqueídes e elementos de vaso, duas classes de elementos traqueais envolvidos no transporte de água no xilema. Traqueídes são células mortas, ocas e alongadas, com paredes altamente lignificadas. As paredes contêm numerosas pontoações — regiões onde não há parede secundária, mas a parede primária permanece. A forma e padrão das pontoações de parede variam com a espécie e o tipo de órgão. Os traqueídes estão presentes em todas as plantas vasculares. Os vasos consistem do empilhamento de dois ou mais elementos. Da mesma forma que os traqueídes, os elementos de vaso são células mortas e são conectadas umas com as outras através de placas de perfuração — regiões da parede onde poros ou orifícios se desenvolveram. Os vasos são conectados a outros vasos e a traqueídes através de pontoações. Os vasos são encontrados na maioria das angiospermas e não estão presentes na maioria das gimnospermas. (B) Electromicrografia de varredura de madeira de carvalho, mostrando dois elementos de vaso que compõem a porção de um vaso. Pontoações grandes são visíveis nas paredes laterais e as paredes terminais estão abertas na placa de perfuração (420x). (C) Diagrama de uma pontoação areolada, com um toro centrado na cavidade da pontoação ou deslocado para uma lado da cavidade e, portanto, bloqueando o fluxo (B © G. Shih-R. Kessel/Visuals Unlimited; C segundo Zimmermann 1983).

ticais sobrepostas. A água flui entre traqueídes por meio de numerosas **pontoações** em suas paredes laterais (Figura 4.6B). Pontoações são regiões microscópicas onde não há parede secundária e a primária é fina e porosa (Figura 4.6C). As pontoações de um traqueíde estão tipicamente localizadas em oposição às pontoações de um traqueíde adjacente, formando **pares de pontoações**. Os pares de pontoações organizam uma rota de baixa resistência para o movimento de água entre traqueídes. A camada porosa entre as pontoações pareadas, que consiste de duas paredes primárias e uma lamela média, é denominada **membrana de pontoação.**

As membranas de pontoação em traqueídes de algumas espécies de coníferas têm um espessamento central chamado **toro** (ver Figura 4.6C). O toro age como uma válvula que fecha a pontoação, alojando-se nos espessamentos circulares ou ovais de parede que bordeiam tais pontoações. Essa disposição do toro é uma maneira eficaz de impedir que perigosas bolhas de ar invadam traqueídes vizinhos (esta formação de bolhas, um processo chamado de cavitação, será discutido adiante).

Os **elementos de vaso** tendem a ser mais curtos e mais largos do que os traqueídes e têm paredes terminais perfuradas, estabelecendo-se uma **placa de perfuração** em cada extremidade da célula. Da mesma forma que os traqueídes, os elementos de vaso têm pontoações em suas paredes laterais (ver Figura 4.6B). Diferentemente dos traqueídes, as paredes terminais perfuradas permitem a elementos de vaso serem empilhados extremidade com extremidade, para formar um conduto maior chamado **vaso** (novamente, ver Figura 4.6B). Os vasos variam em comprimento tanto dentro quanto entre espécies. Os comprimentos máximos de vasos variam de 10 cm a muitos metros. Por causa de suas paredes terminais abertas, os vasos proporcionam uma rota de baixa resistência muito eficiente para o transporte de água. Os elementos de vasos encontrados nas extremidades de um vaso carecem de perfurações nas paredes terminais e se comunicam com vasos vizinhos por meio de pares de pontoações.

O movimento de água através do xilema requer menos pressão do que o movimento através de células vivas

O xilema proporciona uma rota de baixa resistência para o movimento de água, reduzindo, assim, o gradiente de pressão necessário ao transporte de água do solo às folhas. Alguns valores numéricos nos ajudarão a apreciar a extraordinária eficiência do xilema. Será calculada a força propulsora requerida para mover a água através do xilema a uma velocidade típica e a se comparar com a força propulsora que seria necessária para mover a água em uma rota de célula a célula. Para fins de comparação, será usado um valor de 4 mm s^{-1} para a velocidade de transporte no xilema e 40 μm como o raio do vaso. Esta é uma velocidade alta para um vaso tão estreito, de modo que ela tenderá a exagerar o gradiente de pressão requerido para sustentar o fluxo de água no xilema. Usando uma versão da equação de Poiseuille (ver Equação 3.2), pode-se calcular o gradiente de pressão necessário para mover a água a uma velocidade de 4 mm s^{-1} por meio de um tubo *ideal* com um raio interno uniforme de 40 μm. O cálculo gera um valor de 0,02 MPa m^{-1}. A elaboração das pressuposições, equações e cálculo podem ser encontrados no **Tópico 4.4 da Internet**.

Naturalmente, os condutos *reais* de xilema têm as superfícies internas da parede irregulares, e o fluxo de água pelas placas de perfuração e pontoações introduz uma resistência adicional. Tais desvios de um tubo ideal vão aumentar o arrasto friccional acima daquele calculado pela equação de Poiseuille. No entanto, as medidas mostram que a resistência real é maior por um fator de aproximadamente 2 (Nobel, 1999). Assim, a estimativa de 0,02 MPa m^{-1} está dentro da faixa correta para gradientes de pressão encontrados em árvores reais.

Agora, esse valor (0,02 MPa m^{-1}) será comparado com a força propulsora que seria necessária para mover a água na mesma velocidade de uma célula para outra, atravessando, cada vez, a membrana plasmática. Usando a equação de Poiseuille, conforme descrito no **Tópico 4.4 da Internet**, a força propulsora necessária para mover a água através de uma camada de células a 4 mm s^{-1} é calculada como sendo 2×10^8 MPa m^{-1}. Isto é dez ordens de grandeza maior do que a força propulsora necessária para mover a água por meio do nosso vaso de xilema de 40 μm de raio. Nosso cálculo mostra claramente que o fluxo de água pelo xilema é muito mais eficiente que o fluxo de água segundo membranas plasmáticas de células vivas.

Que diferença de pressão é necessária para elevar a água 100 m ao topo de uma árvore?

Tendo em mente o exemplo anterior, será examinado o gradiente de pressão necessário para mover a água até o topo de uma árvore muito alta. As árvores mais altas do mundo são a *Sequoia sempervirens* da América do Norte e o *Eucalyptus regnans* da Austrália. Árvores de ambas as espécies podem exceder 100 m. Se se pensar no caule de uma árvore como sendo um cano longo, pode-se estimar a diferença de pressão necessária para superar o arrasto de atrito do movimento de água do solo ao topo da árvore, multi-

plicando nosso gradiente de pressão de 0,02 MPa m^{-1} pela altura da árvore (0,02 MPa m^{-1} × 100 m = 2 MPa).

Além da resistência de atrito, é preciso considerar a gravidade. O peso de uma coluna ereta de água de 100 m de altura cria uma pressão de 1 MPa na base da coluna de água (100 m × 0,01 MPa m^{-1}). Esse gradiente de pressão decorrente da gravidade precisa ser adicionado àquele requerido para causar o movimento de água por meio do xilema. Assim, calcula-se que uma diferença de pressão de mais ou menos 3 MPa, da base aos ramos apicais, é necessária para transportar a água para cima das árvores mais altas.

A teoria da coesão-tensão explica o transporte de água no xilema

Em teoria, os gradientes necessários para mover água por meio do xilema poderiam resultar da geração de pressões positivas na base da planta ou de pressões negativas no topo da planta. Mencionou-se que algumas raízes podem desenvolver pressões hidrostáticas positivas em seus xilemas – a chamada pressão de raiz. No entanto, a pressão de raiz é tipicamente menor do que 0,1 MPa e desaparece quando a taxa de transpiração é alta, de forma que ela é claramente inadequada para mover a água ao topo de uma árvore alta.

Em vez disso, a água no topo de uma árvore desenvolve uma grande tensão (uma pressão hidrostática negativa), a qual puxa a água pelo xilema. Esse mecanismo, proposto no final do século XIX, é chamado de **teoria coesão-tensão de ascensão da seiva,** pois ele requer as propriedades de coesão da água para suportar grandes tensões nas colunas de água do xilema (para detalhes a respeito da história da pesquisa sobre o movimento de água, ver o **Ensaio 4.1 da Internet**).

Apesar de seus atrativos, a teoria coesão-tensão tem sido uma matéria controversa há mais de um século e continua a gerar debates calorosos. A principal controvérsia gira em torno da questão de se as colunas de água no xilema podem sustentar as grandes tensões (pressões negativas) necessárias para puxar a água para cima de árvores altas.

O mais recente debate começou quando pesquisadores modificaram a técnica da sonda de pressão celular para poder medir diretamente a tensão nos vasos (Balling e Zimmermnn, 1990). Antes dessa inovação, estimativas das pressões no xilema baseavam-se principalmente em medidas foliares com a câmara de pressão (para uma descrição do método da câmara de pressão, ver **Tópico 3.6 da Internet**).

Inicialmente, medidas com a sonda de pressão do xilema não conseguiram encontrar as pressões negativas grandes esperadas, provavelmente porque a cavitação produziu bolhas de gás, introduzidas quando as paredes do xilema foram perfuradas com o capilar de vidro da sonda de pressão (Tyree, 1997). Entretanto, refinamentos cuidadosos da técnica finalmente demonstraram boa concordância entre as medidas com a sonda de pressão e as tensões estimadas com a câmara de pressão (Melcher e cols., 1998; Wei e cols., 1999). Além disso, estudos independentes demonstraram que a água no xilema pode suportar grandes tensões (Pockman e cols., 1995) e que as medidas com a câmara de pressão de folhas não-transpirantes refletem as tensões no xilema (Holbrook e cols., 1995).

A maioria dos pesquisadores concluiu, então, que a teoria básica da coesão-tensão é sólida (Steudle, 2001) (para hipóteses alternativas, ver Canny (1998) e **Ensaios 4.1** e **4.2 da Internet**). Pode-se prontamente demonstrar as tensões no xilema intacto perfurando-o com uma gota de tinta na superfície de um caule de uma planta transpirante. Quando a tensão no xilema é atenuada, a tinta é conduzida instantaneamente para dentro do dele, resultando em listras visíveis ao longo do caule.

O transporte de água no xilema em árvores enfrenta desafios físicos

A grandes tensões que se desenvolvem no xilema de árvores (ver **Ensaio 4.3 da Internet**) e de outras plantas podem criar alguns problemas. Primeiro, a água sob tensão transmite uma força interna às paredes do xilema. Se as paredes celulares fossem fracas ou maleáveis, elas colapsariam sob influência desta tensão. Os espessamentos secundários de parede e a lignificação dos traqueídes e dos vasos são adaptações que compensam essa tendência ao colapso.

Um segundo problemas é que a água sob tais tensões está em um *estado fisicamente metaestável*. No Capítulo 3 foi mencionado que a força de rompimento experimentalmente medida da água desgaseificada (água que foi fervida para remover gases) é superior a 30 MPa, valor muito maior que a tensão estimada de 3 MPa, necessária para levantar a água ao topo das árvores mais altas, de forma que a água no xilema normalmente não atingiria tensões que a desestabilizariam.

No entanto, à medida que a tensão na água aumenta, existe uma maior tendência do ar ser aspirado através dos poros microscópicos das paredes celulares do xilema. Esse fenômeno é chamado de *semeadura de ar* (*air seeding*). Uma segunda forma pela qual bolhas podem se formar nos condutos do xilema deve-se à reduzida solubilidade dos gases em gelo (Davis e cols., 1999). O congelamento dos condutos do xilema leva à formação de bolhas. Uma vez formada dentro da coluna de água sob tensão, a bolha de ar se expandirá, pois os gases não podem resistir a forças de tração. O fenômeno de formação de bolhas é denominado **cavitação** ou **embolia.** Ele é similar à obstrução do vapor na linha de combustível de um automóvel ou à embolia em um vaso sangüíneo. A cavitação quebra a continuidade da coluna de água e impede o transporte de água no xilema (Tyree e Sperry, 1989; Hacke e cols., 2001).

Tais quebras nas colunas de água em plantas são bastante comuns. Com equipamento apropriado, pode-se "escutar" as colunas de água quebrarem (Jackson e cols., 1999). Quando as plantas são desprovidas de água, pulsos de som podem ser detectados. Os pulsos ou cliques correspondem, presumivelmente, à formação e à rápida expansão de bolhas de ar no xilema, resultando em ondas de choque acústico de alta freqüência pelo resto da planta. Tais interrupções na continuidade da água do xilema, se não reparadas, seriam desastrosas à planta. Por bloquearem a rota principal de transporte de água, essas embolias causariam desidratação e morte das folhas.

As plantas minimizam as conseqüências da cavitação do xilema

O impacto da cavitação do xilema na planta é minimizado de várias maneiras. Uma vez que os elementos traqueais do xilema são interconectados, uma bolha de gás pode, em princípio, se expandir e preencher toda a rede de condutos. Na prática, as bolhas de gás não se espalham para muito longe, porque, em expansão,

elas não podem passar facilmente pelos pequenos poros da membrana das pontoações. Devido à interconexão dos capilares do xilema, uma bolha de gás não consegue parar completamente o fluxo de água. Em vez disso, a água pode desviar do ponto bloqueado, trafegando para condutos vizinhos conectados ao conduto bloqueado (Figura 4.7). Assim, o comprimento finito dos condutos formados por traqueídes e vasos do xilema, apesar de resultar em aumento de resistência ao fluxo de água, também proporciona uma forma de restringir a cavitação.

As bolhas de gás podem ser eliminadas do xilema. À noite, quando a transpiração é baixa, o Ψ_p do xilema aumenta e os vapores de água e de gases podem simplesmente redissolver-se na solução do xilema. Além disso, conforme foi visto, algumas plantas desenvolvem pressões positivas (pressões de raiz) no xilema. Tais pressões encolhem a bolha de gás e fazem com que os gases se dissolvam. Estudos recentes indicam que a cavitação pode ser reparada mesmo quando a água no xilema encontra-se sob tensão (Holbrook e cols., 2001). Um mecanismo para tal reparo ainda não é conhecido e permanece como tema de pesquisas em andamento (ver **Ensaio 4.4 da Internet**). Finalmente, muitas plantas têm crescimento secundário, onde novo xilema forma-se a cada ano. O xilema novo torna-se funcional antes que o velho cesse sua função, devido à oclusão por bolhas de ar ou por substâncias secretadas pela planta.

FIGURA 4.7 Traqueídes (direita) e vasos (esquerda) de uma série de rotas interconectadas e paralelas para o movimento de água. A cavitação bloqueia o movimento de água por causa da formação de condutos cheios de ar (embolizados). Uma vez que os condutos do xilema são interconectados por aberturas ("pontoações areoladas") em suas paredes secundárias espessas, a água pode desviar do vaso bloqueado, movendo-se para elementos traqueais adjacentes. Os poros muito pequenos nas membranas das pontoações ajudam a impedir que embolismos espalhem-se entre os condutos do xilema. Assim, no diagrama da direita, o gás está contido dentro de um único traqueíde cavitado. No diagrama da esquerda, o gás preencheu todo o vaso cavitado, aqui mostrado como sendo composto por três elementos de vaso, separados por placas de perfuração escalariformes. Na natureza, os vasos podem ser muito longos (até vários metros de comprimento) e, assim, compostos por vários elementos de vaso.

A evaporação da água na folha gera uma pressão negativa no xilema

As tensões necessárias para puxar a água pelo xilema são o resultado da evaporação de água das folhas. Na planta intacta, a água é trazida às folhas através do xilema dos feixes vasculares (ver Figura 4.1), que se ramificam em uma rede de **nervuras** muito finas e às vezes intricada (Figura 4.8). Tal **padrão de nervação** torna-se tão finamente ramificado que a maioria das células em uma folha típica está a menos de 0,5 mm de uma nervura. A partir do xilema, a água flui para dentro das células das folhas e ao longo das paredes celulares.

A pressão negativa que faz com que a água ascenda através do xilema desenvolve-se na superfície das paredes celulares na folha. A situação é análoga àquela do solo. A parede celular age como um

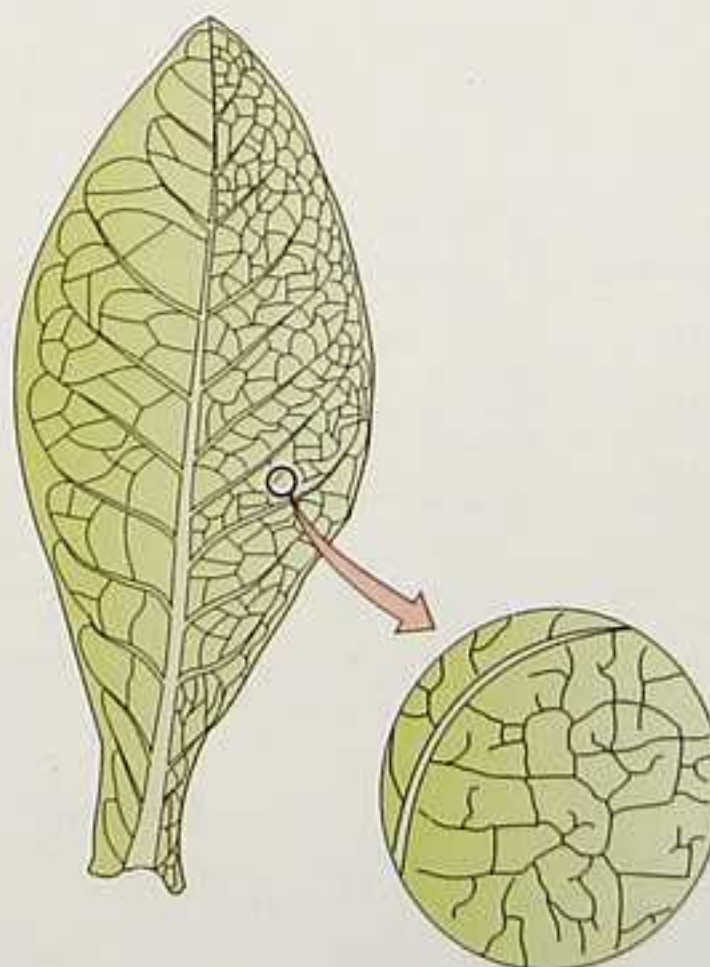
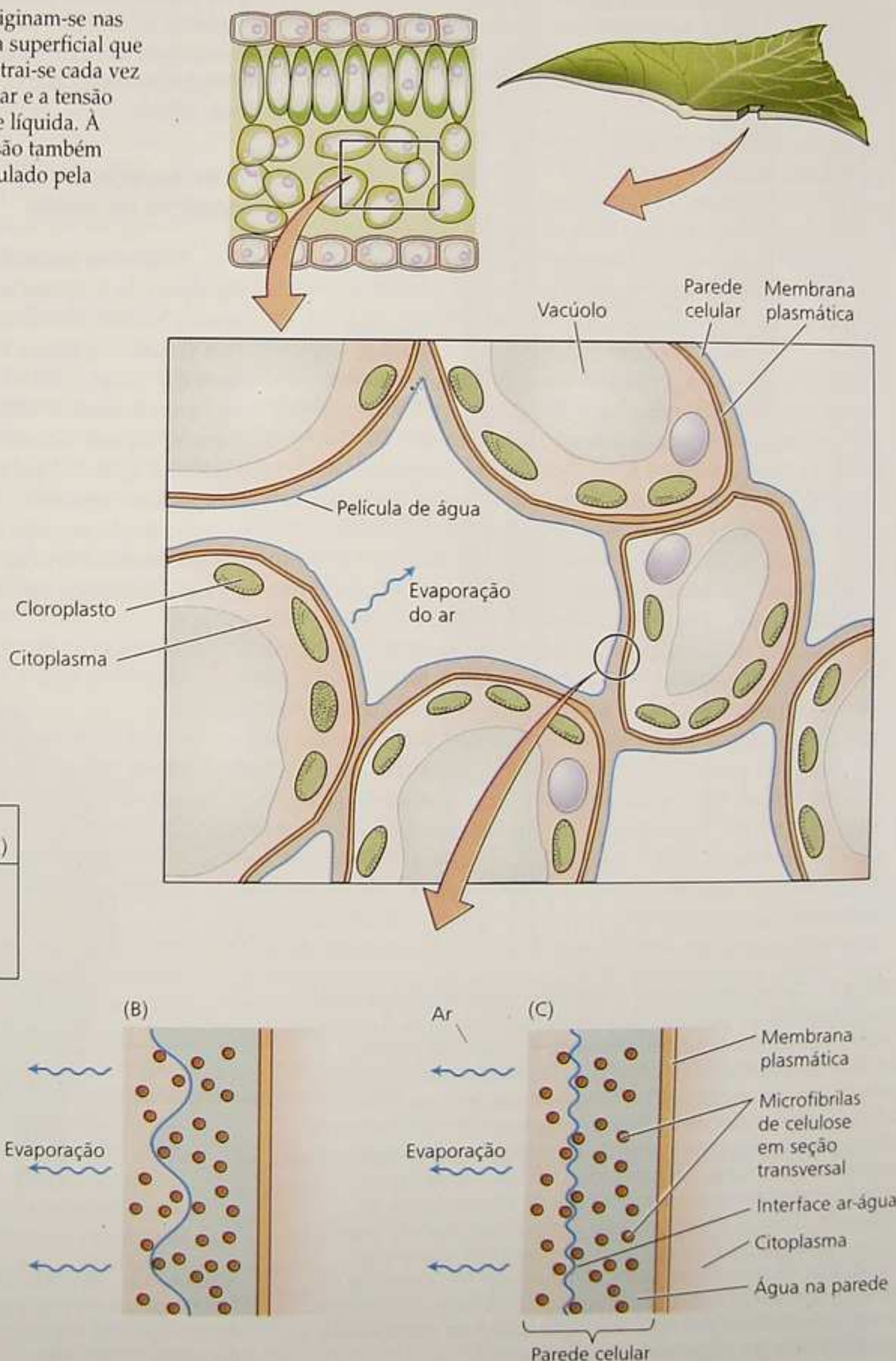



FIGURA 4.8 Nervação de uma folha de tabaco, mostrando a ramificação da nervura principal em nervuras laterais finas. O padrão de nervação traz a água do xilema para perto de cada célula da folha (Kramer e Boyer, 1995).

capilar muito fino encharcado com água. A água adere às microfibrilas de celulose e a outros componentes hidrofílicos da parede. As células do mesofilo estão em contato direto com a atmosfera por meio de um sistema extenso de espaços intercelulares.

Inicialmente, a água evapora de uma fina película que cobre esses espaços. À medida que a água é perdida para a atmosfera, a superfície da água remanescente é deslocada para os interstícios da parede celular (Figura 4.9), onde forma interfaces curvadas ar-água. Devido à alta tensão superficial da água, a curvatura dessas interfaces induz a uma tensão ou pressão negativa na água. À medida que mais água é removida da parede, o raio de curvatura dessas interfaces ar-água decresce e a pressão da água torna-se mais negativa (ver Equação 4.1). Assim, a força motriz para o transporte no xilema é gerada nas interfaces ar-água dentro da folha.

FIGURA 4.9 Tensões ou pressões negativas originam-se nas folhas. À medida que a água evapora da película superficial que cobre as paredes celulares do mesofilo, a água retrai-se cada vez mais para dentro dos interstícios da parede celular e a tensão superficial provoca uma pressão negativa na fase líquida. À medida que o raio da curvatura decresce, a pressão também decresce (torna-se mais negativa), conforme calculado pela Equação 4.1.

	Raio de curvatura (µm)	Pressão hidrostática (MPa)
(A)	0.5	−0.3
(B)	0.05	−3
(C)	0.01	−15

MOVIMENTO DE ÁGUA DA FOLHA PARA A ATMOSFERA

Depois que a água evaporou da superfície celular para o espaço intercelular, a difusão é o modo principal de qualquer movimento posterior de água para fora da folha. A cutícula cerosa que cobre a superfície foliar é uma barreira muito efetiva ao movimento de água. Estima-se que apenas cerca de 5% da água perdida pelas folhas sai pela cutícula. Quase toda a água perdida por folhas típicas dá-se por difusão de vapor de água pelos poros diminutos dos estômatos, os quais são normalmente mais abundantes na superfície abaxial da folha.

Em sua trajetória da folha para a atmosfera, água é puxada do xilema para as paredes celulares do mesofilo, de onde evapora para os espaços intercelulares da folha (Figura 4.10). O vapor de água sai, então, da folha por meio do poro estomático. A água move-se nessa trajetória predominantemente por difusão; assim, o movimento de água é controlado pelo *gradiente de concentração* de vapor de água.

Agora, examinaremos a força propulsora da transpiração foliar, as principais resistências na rota de difusão da folha para a atmosfera e as características anatômicas da folha que regulam a transpiração.

O vapor de água se difunde rapidamente no ar

O Capítulo 3 mostrou que a difusão em líquidos é lenta e, assim, efetiva apenas dentro de dimensões celulares. Quanto tempo levaria para que uma molécula de água se difundisse das superfícies das paredes celulares dentro da folha para a atmosfera externa? O Capítulo 3 mostrou que o tempo médio necessário para que uma molécula se difunda por uma distância L é igual a L^2/Ds, onde Ds é o coeficiente de difusão. A distância pela qual uma molécula de água tem de difundir-se do sítio de evaporação dentro da folha para a atmosfera externa é de aproximadamente 1 mm (10^{-3} m) e o coeficiente de difusão da água no ar é 2,4 × 10^{-5} m^2 s^{-1}. Assim, o tempo médio necessário para que uma molécula de água escape para a atmosfera é de aproximadamente 0,042 s. Dessa maneira, vê-se que a difusão é adequada para mover vapor de água pela fase gasosa da folha. A razão pela qual este tempo é tão mais curto do que os 2,5 s calculados no Capítulo 3 para uma molécula de glicose se difundir através de uma célula

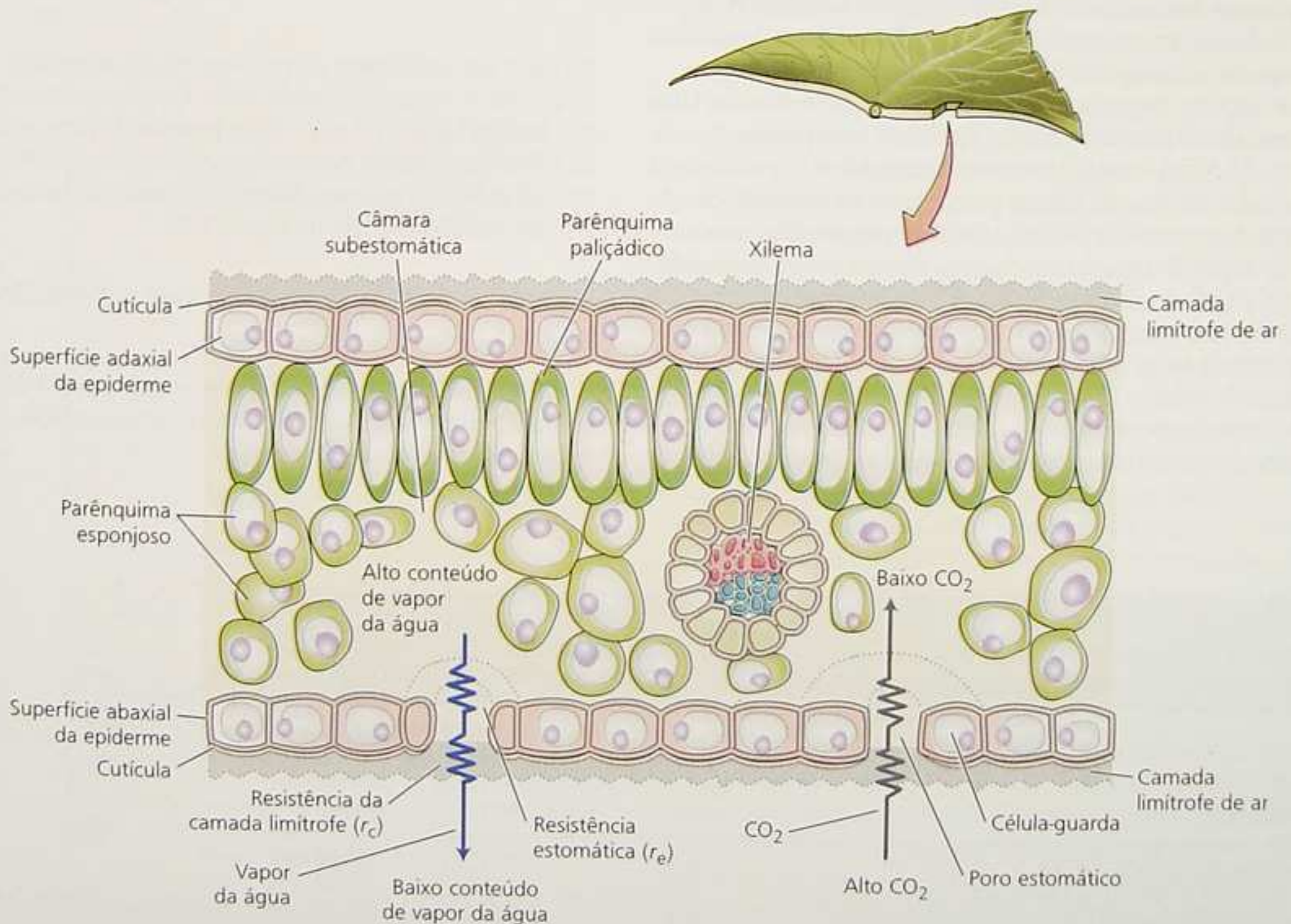



FIGURA 4.10 Trajetória da água pela folha. A água é puxada do xilema para as paredes celulares do mesofilo, de onde evapora para os espaços intercelulares dentro da folha. O vapor da água difunde-se, então, pelos espaços intercelulares da folha, através do poro estomático e da camada limítrofe de ar parado situada junto à superfície foliar. O CO_2 difunde-se na direção oposta, ao longo de seu gradiente de concentração (baixa no interior, mais alta no exterior).

de 50 μm é que a difusão é muito mais rápida em um gás que em um líquido.

A transpiração foliar depende de dois fatores principais: (1) a **diferença de concentração de vapor de água** entre os espaços intercelulares das folhas e a atmosfera externa e (2) a **resistência à difusão (r)** desta rota. Em primeiro lugar será discutido como a diferença na concentração de vapor de água controla as taxas de transpiração.

A força propulsora para a perda de água é a diferença de concentração de vapor de água

A diferença de concentração de vapor d'água é expressa como $c_{wv(folha)} - c_{wv(ar)}$. A concentração de vapor d'água do ar ($c_{wv(ar)}$) pode ser prontamente medida, mas a da folha ($c_{wv(folha)}$) é mais difícil de ser determinada.

Enquanto o volume dos espaços intercelulares dentro da folha é pequeno, a superfície úmida da qual a água evapora é comparativamente grande (o volume dos espaços intercelulares é de aproximadamente 5% do volume total da folha para acículas de pinheiro, 10% para folhas de milho, 30% para cevada e 40% para folhas de tabaco). Em comparação com o volume dos espaços intercelulares, a área de superfície interna da qual a água evapora pode ser de sete a trinta vezes a área foliar externa. Esta elevada razão de área de superfície para volume gera um rápido equilíbrio de vapor dentro da folha. Assim, pode-se assumir que os espaços intercelulares dentro da folha aproximam-se do equilíbrio de potencial hídrico com as superfícies das paredes celulares das quais a água líquida está evaporando.

Um aspecto importante dessa relação é que dentro da faixa de potenciais hídricos encontrados em folhas transpirantes (geralmente < –2,0 MPa), o equilíbrio na concentração de vapor de água está ao redor de poucos pontos percentuais da concentração de saturação do vapor de água, o que permite que se estime a concentração de vapor de água dentro da folha a partir de sua temperatura, a qual é fácil de medir (o **Tópico 4.5 da Internet** mostra como se pode calcular a concentração de vapor de água nos espaços intercelulares da folha e discute outros aspectos das relações hídricas dentro da folha).

A concentração de vapor de água, c_{wv}, muda em vários pontos ao longo da rota de transpiração. Vê-se na Tabela 4.2 que c_{wv} decresce em cada etapa da rota que vai da superfície da parede celular até a atmosfera fora da folha. Os pontos importantes a serem lembrados são (1) que a força propulsora para perda de água da folha é a diferença na concentração *absoluta* (diferença em c_{wv}, em mol m^{-3}) e (2) que essa diferença depende da temperatura foliar, conforme é mostrado na Figura 4.11.

Temperatura (°C)	c_{wv} (mol m^{-3})
0	0,269
5	0,378
10	0,522
15	0,713
20	0,961
25	1,28
30	1,687
35	2,201
40	2,842
45	3,637

FIGURA 4.11 Concentração de vapor de água em ar saturado, em função da temperatura do ar.

A perda de água também é regulada por resistências do trajeto

O segundo fator importante a governar a perda de água pelas folhas é a resistência à difusão na rota da transpiração, que consiste de dois componentes variáveis:

TABELA 4.2
Valores representativos de umidade relativa, concentração absoluta de vapor de água e potencial hídrico para quatro pontos ao longo da rota de perda de água de uma folha

		Vapor de água	
Localização	**Umidade relativa**	**Concentração (mol m^{-3})**	**Potencial (MPa)[a]**
Espaços intercelulares (25°C)	0,99	1,27	−1,38
Imediatamente dentro do poro estomático (25°C)	0,95	1,21	−7,04
Imediatamente fora do poro estomático (25°C)	0,47	0,60	−103,70
Ar (20°C)	0,50	0,50	−93,60

Fonte: Adaptado de Nobel, 1999.
Nota: Ver Figura 4.10
[a] Calculado usando Equação 4.5.2 no **Tópico 4.5 da Internet**; com valores para $RT/\bar{V}_w$ de 135 MPa a 20°C e 137,3 MPa a 25°C.

1. A resistência associada à difusão pelo poro estomático, a **resistência estomática foliar (r_s).**
2. A resistência causada pela camada de ar parado junto à superfície foliar, por meio da qual o vapor tem de se difundir para alcançar o ar turbulento da atmosfera (ver Figura 4.10). Essa segunda resistência, r_b, é chamada de **resistência da camada limítrofe.** Este tipo de resistência será discutido antes de se considerar a resistência estomática.

A espessura da camada limítrofe é determinada sobretudo pela velocidade do vento. Quando o ar que circunda a folha encontra-se muito parado, a camada de ar parado junto à superfície foliar pode ser tão espessa que se torna a principal barreira à perda de vapor de água pela folha. Aumentos nas aberturas estomáticas sob tais condições têm pouco efeito na taxa de transpiração (Figura 4.12) (apesar de que o fechamento completo dos estômatos ainda reduzirá a transpiração).

Quando a velocidade do vento é alta, o ar em movimento reduz a espessura da camada limítrofe na superfície da folha, reduzindo a resistência dessa camada. Sob tais condições, a resistência estomática controlará em grande parte a perda de água da folha.

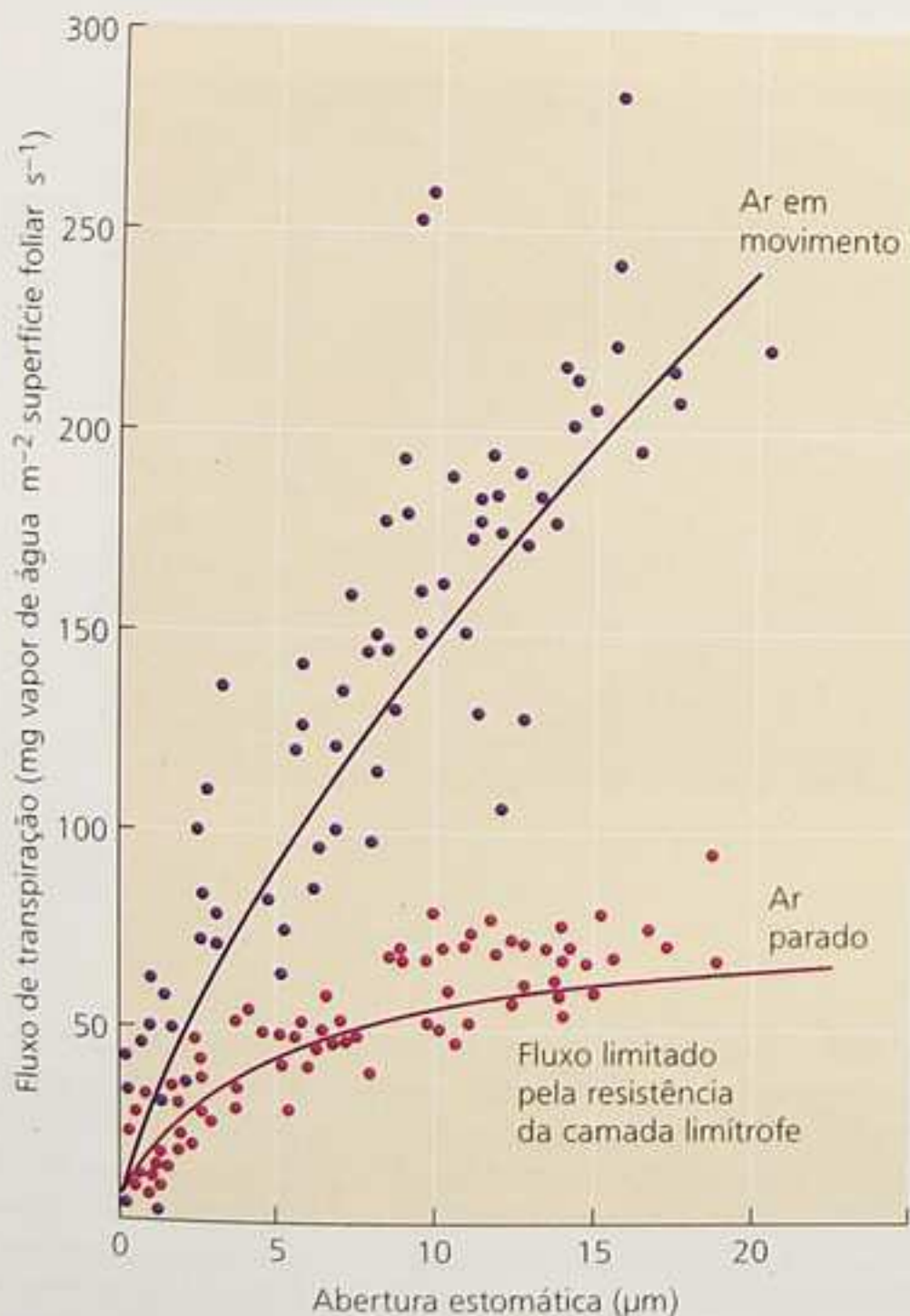



FIGURA 4.12 Dependência do fluxo de transpiração em relação à abertura estomática em *Zebrina pendula*, sob ar parado e sob ar em movimento. A camada limítrofe é maior e mais limitante no ar parado do que no ar em movimento. Como resultado, a abertura estomática tem menos controle sobre a transpiração no ar parado (Bange, 1953).

Vários aspectos anatômicos e morfológicos da folha podem influenciar na espessura da camada limítrofe. Os tricomas nas superfícies foliares podem servir como quebra-ventos microscópicos. Algumas plantas têm estômatos em cavidade, o que proporciona um abrigo externo ao poro estomático. O tamanho e a forma da folha também influenciam a maneira como o vento sopra ao longo da superfície foliar. Apesar destes e de outros fatores intervirem na camada limítrofe, eles não são características que podem ser alteradas de uma hora para outra ou mesmo de um dia para outro. Para um ajuste a curto prazo, o controle das aberturas estomáticas pelas células-guarda desempenha um papel crucial na regulação da transpiração foliar.

O controle estomático acopla a transpiração foliar à fotossíntese foliar

Por ser a cutícula quase impermeável à água, a maior parte da transpiração foliar resulta da difusão de vapor de água através do poro estomático (ver Figura 4.10). Os poros estomáticos microscópicos proporcionam uma rota de baixa resistência para o movimento de difusão de gases por meio da epiderme e da cutícula. Ou seja, os poros estomáticos reduzem a resistência à difusão para a perda de água pelas folhas. As mudanças na resistência estomática são importantes para a regulação da perda de água pela planta e para o controle da taxa de absorção de dióxido de carbono necessária à fixação continuada de CO_2 durante a fotossíntese.

Todas as plantas terrestres enfrentam demandas competitivas de absorverem CO_2 da atmosfera enquanto limitam a perda de água. A cutícula que recobre as superfícies expostas das plantas serve de barreira efetiva à perda de água, protegendo, assim, a planta contra a dessecação. No entanto, as plantas não podem impedir a difusão de água para fora sem, ao mesmo tempo, excluir o CO_2 da folha. O problema é acentuado pelo fato de o gradiente de concentração para absorção de CO_2 ser muito menor que o gradiente de concentração que governa a perda de água.

Quando a água é abundante, a solução funcional para o problema é a regulação *temporal* das aberturas estomáticas – abertas durante o dia, fechadas à noite. À noite, quando não há fotossíntese e, assim, nenhuma demanda por CO_2 dentro da folha, as aberturas estomáticas mantêm-se pequenas, impedindo perda desnecessária de água. Em uma manhã ensolarada, quando há água abundante e a radiação solar incidente nas folhas favorece alta atividade fotossintética, a demanda por CO_2 dentro da folha é grande e os poros estomáticos estão amplamente abertos, diminuindo a resistência estomática à difusão do CO_2. A perda de água por transpiração é também substancial em tais condições, mas, uma vez que o suprimento hídrico é abundante, é vantajoso para a planta intercambiar a água por produtos da fotossíntese, essenciais para o crescimento e reprodução.

Por outro lado, quando a água do solo é menos abundante, os estômatos abrirão menos ou até mesmo permanecerão fechados em uma manhã ensolarada. Mantendo seus estômatos fechados sob condições de seca, a planta evita a desidratação. Os valores para ($c_{wv(folha)} - c_{wv(ar)}$) e para r_b não são prontamente suscetíveis ao controle biológico. Entretanto, a resistência estomática (r_s) pode ser regulada pela abertura e pelo fechamento do poro estomático. Tal controle biológico é exercido por um par de células epidérmicas especializadas, as **células-guarda,** que circundam o poro estomático (Figura 4.13).

As paredes celulares das células-guarda têm características especializadas

As células-guarda podem ser encontradas em folhas de todas as plantas vasculares e também estão presentes em órgãos de plantas mais primitivas, como hepáticas e musgos (Ziegler, 1987). As células-guarda mostram diversidade morfológica considerável, mas podem ser distinguidos dois tipos principais: um é típico de gramíneas e outras poucas monocotiledôneas, como palmeiras; o outro é encontrado em todas as dicotiledôneas, em muitas monocotiledôneas e em musgos, samambaias e gimnospermas.

Em gramíneas (ver Figura 4.13A), as células-guarda têm um formato característico de haltere, com extremidades bulbosas. O poro propriamente dito é uma longa fenda localizada entre as duas "alças" dos halteres. Essas células-guarda são sempre flanqueadas por um par de células epidérmicas diferenciadas, chamadas de

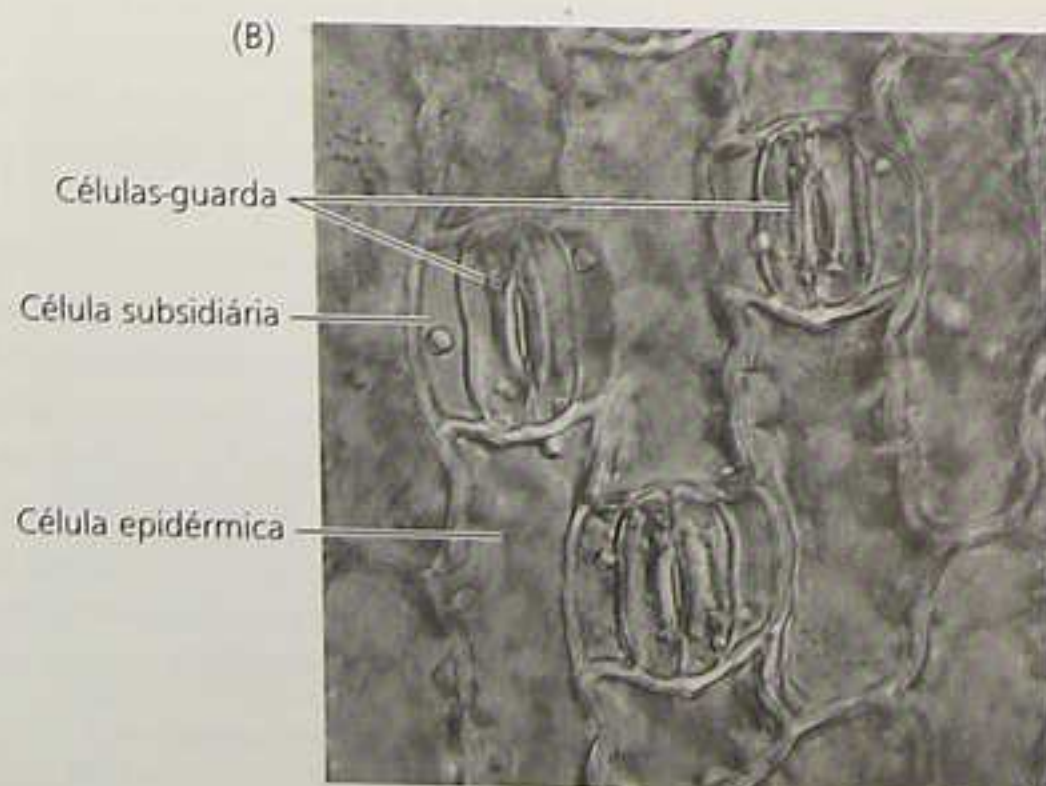
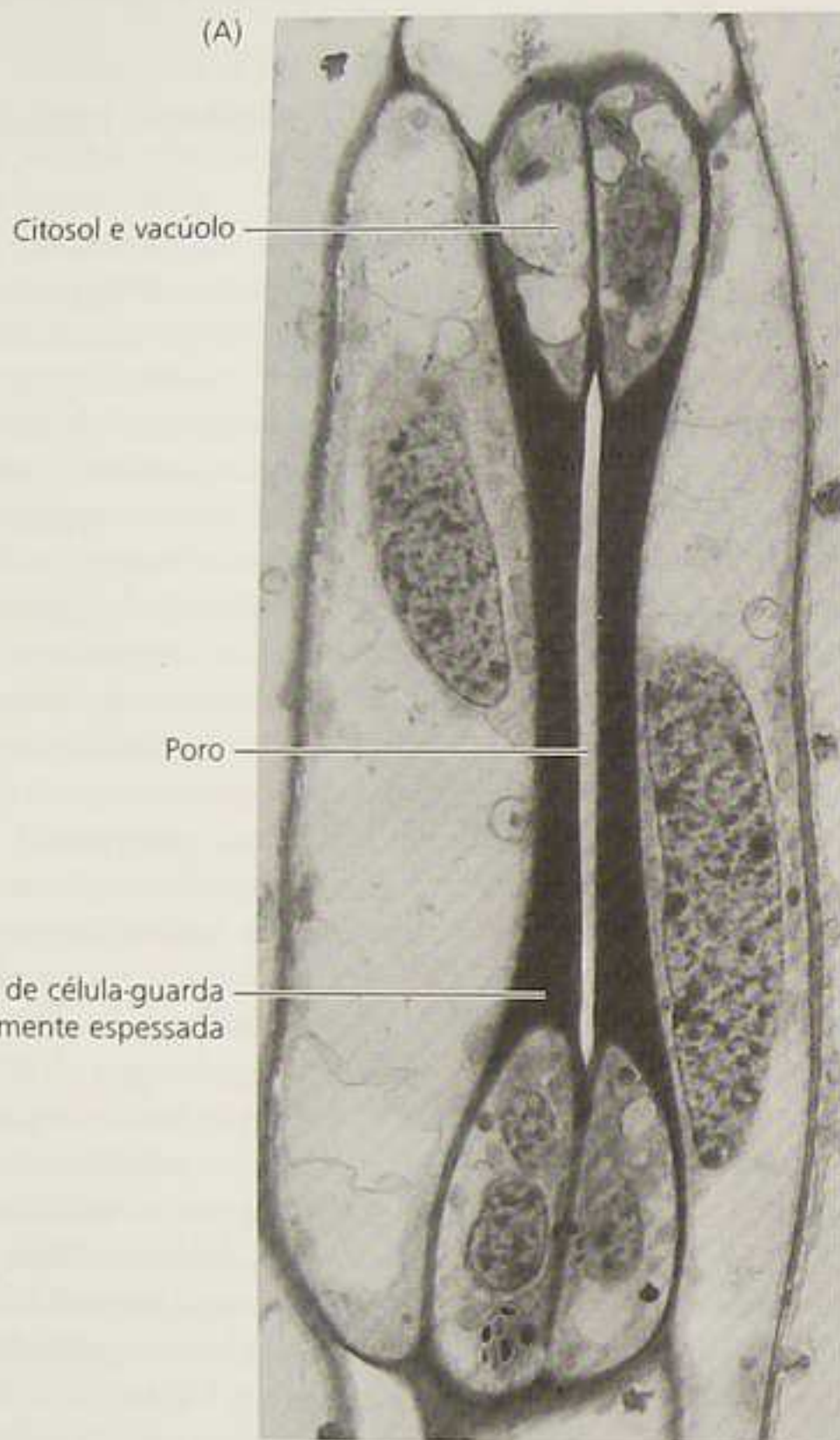



FIGURA 4.13 Micrografias de estômatos. (A) Electromicrografia de um estômato de gramínea. As extremidades bulbosas de cada célula-guarda mostram seus conteúdos citosólicos e são unidas por paredes fortemente espessadas. O poro estomático separa as duas porções medianas das células-guarda (2560x). (B) Complexos estomáticos de *Carex* (ciperácea), vistos ao microscópio óptico de contraste interferencial. Cada complexo consiste de duas células-guarda circundando um poro e duas células subsidiárias nos flancos (550x). (C) Electromicrografia de varredura de epiderme de cebola. O painel superior mostra a superfície externa da folha, com um poro estomático inserido na cutícula. O painel inferior apresenta um par de células-guarda voltadas para a cavidade estomática, em direção ao interior da folha (1640x). (A de Palevitz, 1981; B de Jarvis e Mansfield, 1981; A e B cedidas por B. Palevitz; micrografias em C de Zeiger e Hepler, 1976 [topo] e E. Zeiger e N. Burnstein [base].)

células subsidiárias, que auxiliam as células-guarda a controlar os poros estomáticos (ver Figura 4.13B). As células-guarda, as células subsidiárias e o poro constituem o chamado **complexo estomático.**

Em dicotiledôneas e em monocotiledôneas não-gramíneas, cada célula-guarda é reniforme e, em conjunto, as duas têm um contorno elíptico com o poro no centro (ver Figura 4.13C). Apesar de as células subsidiárias não serem incomuns em espécies desses grupos taxonômicos, elas muitas vezes não estão presentes e, neste caso, as células-guarda estão circundadas por células semelhantes às demais células epidérmicas.

Uma característica peculiar das células-guarda é a estrutura própria de suas paredes. Partes delas são substancialmente espessadas (Figura 4.14) e podem ter espessura superior a 5 μm, em comparação com a espessura de 1 a 2 μm, típica de células epidérmicas. Em células-guarda reniformes, um padrão de espessamento diferencial resulta em paredes internas e externas (laterais) muito espessas, uma parede dorsal fina (a parede em contato com as células epidérmicas) e outra ventral (poro) de certa forma espessada (ver Figura 4.14). As porções da parede que estão voltadas para a atmosfera estendem-se em proeminências bem desenvolvidas, que formam o poro propriamente dito.

O alinhamento das **microfibrilas de celulose**, que reforçam todas as paredes celulares vegetais e que são importantes determinantes da forma da célula (ver Capítulo 15), desempenha um papel essencial na abertura e no fechamento do poro estomático. Em células normais dotadas de forma cilíndrica, as microfibrilas de celulose estão orientadas transversalmente em relação ao eixo longo da célula. Como conseqüência, a célula expande-se na direção de seu eixo longo, pois o reforço de celulose oferece menor resistência a ângulos retos em relação à sua orientação.

Nas células-guarda, a organização de microfibrilas é diferente. As células-guarda reniformes têm microfibrilas de celulose projetadas radialmente a partir do poro (Figura 4.15A). Assim, a circunferência celular é reforçada como um pneu radial com cinta de aço e as células-guarda curvam-se para fora durante a abertura estomática (Sharpe e cols., 1987). Em gramíneas, as células-guarda em forma de haltere funcionam como barras com extremidades infláveis. À medida que a extremidade bulbosa das células aumenta de volume e incha, as barras são separadas uma da outra e a fenda entre elas se alarga (Figura 4.15B).

Um aumento na pressão de turgor da célula-guarda abre o estômato

As células-guarda funcionam como válvulas hidráulicas multissensoriais. Fatores ambientais, tais como intensidade e qualidade de luz, temperatura, umidade relativa e concentração intracelular de CO_2, são percebidos pelas células-guarda e esses sinais são integrados em respostas estomáticas bem definidas. Se

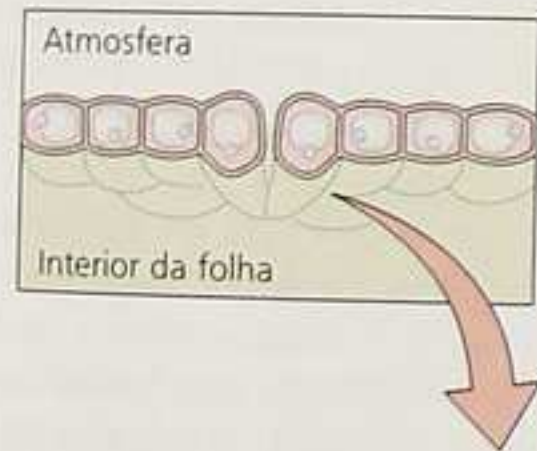



FIGURA 4.14 Electromicrografia mostrando um par de células-guarda da dicotiledônea *Nicotiana tabacum* (tabaco). A seção é perpendicular à superfície principal da folha. O poro está voltado para a atmosfera, e a base para a cavidade subestomática. Observe o padrão de espessamento irregular das paredes, determinando a deformação assimétrica das células-guarda quando seus volumes aumentam durante a abertura estomática (Sack, 1987, cedida por F. Sack).

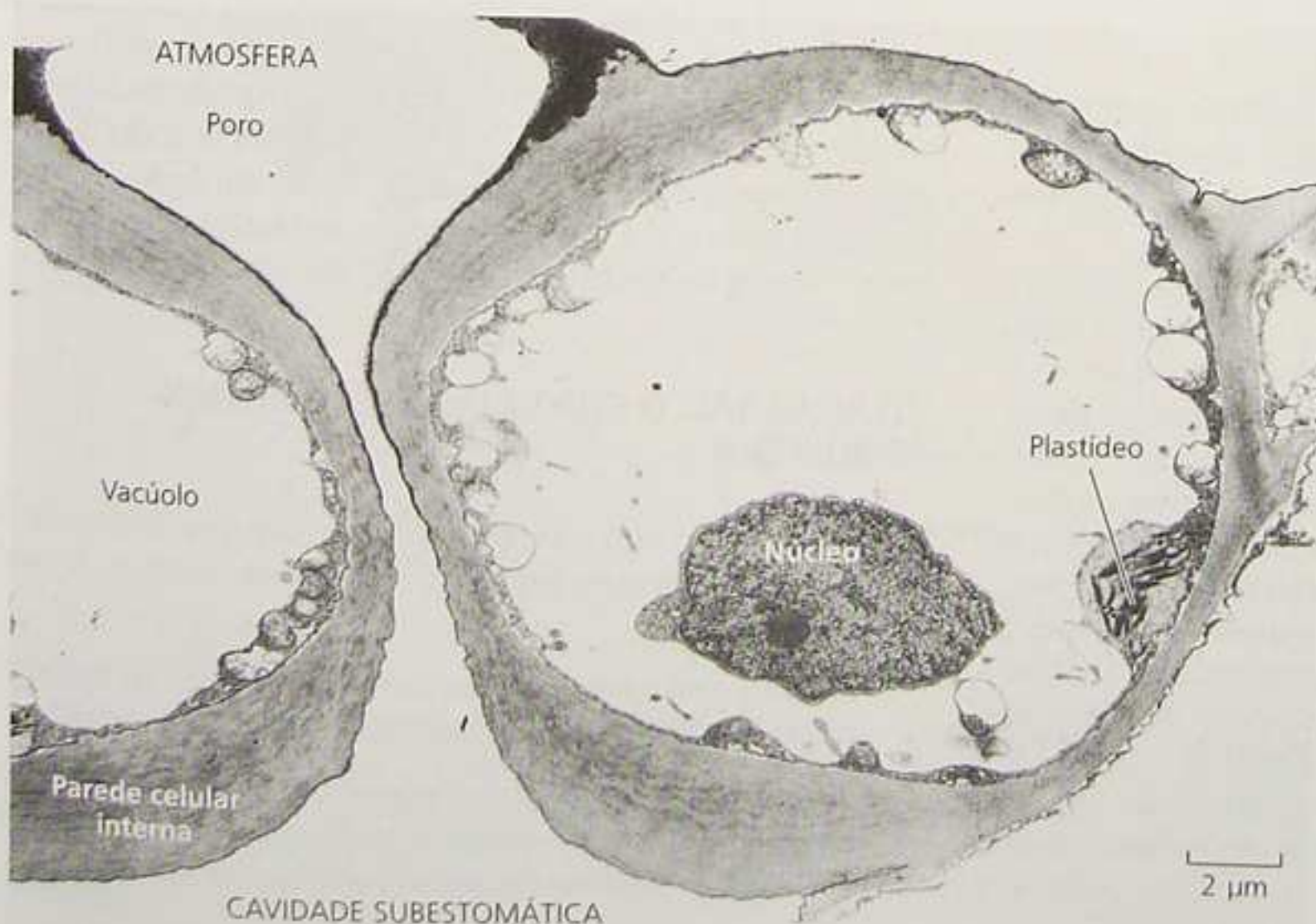
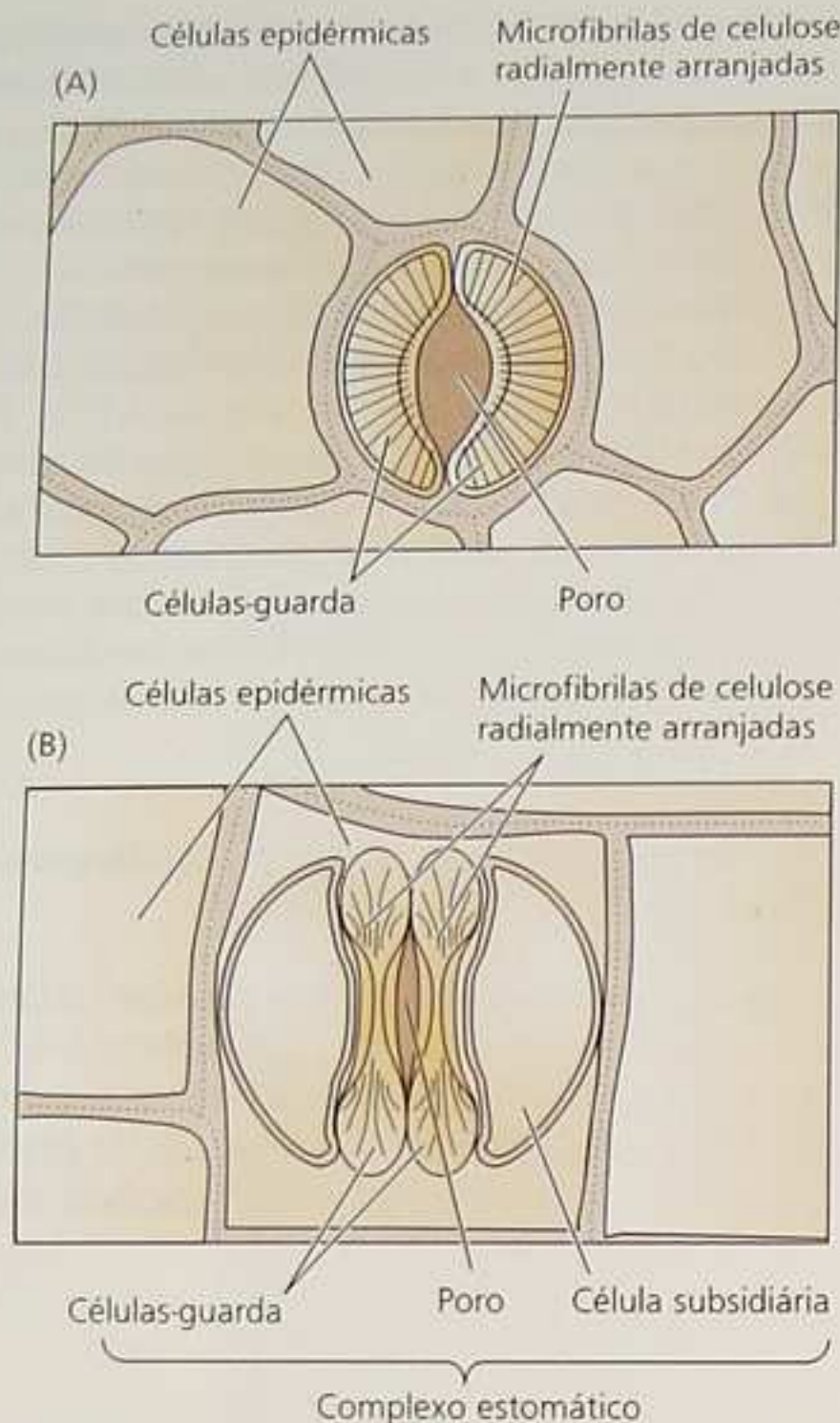



FIGURA 4.15 O alinhamento radial das microfibrilas de celulose em células-guarda e em células epidérmicas de (A) um estômato reniforme e (B) um estômato do tipo gramínea (Meidner e Mansfield, 1968).

folhas mantidas no escuro são iluminadas, o estímulo luminoso é percebido pelas células-guarda como um sinal de abertura, desencadeando uma série de respostas que resultam na abertura do poro estomático.

Os aspectos iniciais desse processo são a absorção iônica e outras mudanças metabólicas nas células-guarda, as quais serão discutidas em detalhe no Capítulo 18. Aqui, observar-se-ão os efeitos do decréscimo no potencial osmótico (Ψ_s) resultante da absorção iônica e da biossíntese de moléculas orgânicas nas células-guarda. As relações hídricas nas células-guarda seguem as mesmas regras que nas outras células. À medida que o Ψ_s decresce, o potencial hídrico decresce e a água conseqüentemente move-se para dentro das células-guarda. À medida que a água entra na célula, a pressão de turgor aumenta. Por causa das propriedades elásticas de sua paredes, as células-guarda podem aumentar de forma reversível seus volumes em 40 a 100%, dependendo da espécie. Devido ao espessamento diferencial das paredes das células-guarda, tais mudanças em volume levam à abertura ou ao fechamento do poro estomático.

A razão de transpiração mede a relação entre perda de água e ganho de carbono

A eficiência das plantas em moderar a perda de água, ao mesmo tempo que permitem absorção suficiente de CO_2 para a fotossíntese, pode ser abordada por um parâmetro denominado **razão de transpiração.** Esse valor é definido como a quantidade de água transpirada pela planta dividida pela quantidade de dióxido de carbono assimilado pela fotossíntese.

Para plantas típicas em que o primeiro produto estável da fixação de carbono é um composto de três carbonos (tais plantas são chamadas de plantas C_3; ver Capítulo 8), cerca de 500 moléculas de água são perdidas para cada molécula de CO_2 fixada pela fotossíntese, dando uma razão de transpiração de 500 (Algumas vezes a recíproca da razão de transpiração, chamada de *eficiência no uso da água*, é citada. Plantas com uma razão de transpiração de 500 têm uma eficiência no uso da água de 1/500 ou 0,002.).

A grande razão de efluxo de H_2O para influxo de CO_2 resulta de três fatores:

1. O gradiente de concentração que governa a perda de água é cerca de 50 vezes maior do que aquele que administra o influxo de CO_2. Em grande parte, essa diferença é devida à baixa concentração de CO_2 no ar (cerca de 0,03%) e à concentração relativamente alta de vapor de água dentro da folha.
2. O CO_2 difunde-se cerca de 1,6 vezes mais lentamente pelo ar que a água (a molécula de CO_2 é maior do que a de H_2O e tem um menor coeficiente de difusão).
3. O CO_2 precisa cruzar a membrana plasmática, o citoplasma e o envoltório do cloroplasto antes de ser assimilado. Tais membranas aumentam a resistência da rota de difusão do CO_2.

Algumas plantas estão adaptadas para a vida em ambientes ou estações do ano especialmente quentes. Essas plantas, denominadas C_4 e CAM, utilizam variações da rota fotossintética usual para a fixação do dióxido de carbono. As plantas com fotossíntese C_4 (nas quais um composto de quatro carbonos é o primeiro produto estável da fotossíntese; ver Capítulo 8) em geral transpiram menos água por molécula de CO_2 fixado; uma razão de transpiração típica para plantas C4 é de cerca de 250. As plantas adaptadas ao deserto e com fotossíntese CAM (metabolismo ácido das crassuláceas), nas quais o CO_2 é, de início, fixado em ácidos orgânicos de quatro carbonos à noite, têm razões de transpiração ainda menores; valores de aproximadamente 50 não são pouco usuais.

VISÃO GERAL: O *CONTINUUM* SOLO-PLANTA-ATMOSFERA

Viu-se que o movimento de água do solo, por intermédio da planta, para a atmosfera envolve diferentes mecanismos de transporte:

- No solo e no xilema, a água move-se por fluxo de massa em resposta a um gradiente de pressão ($\Delta\Psi_p$).
- Na fase de vapor, a água move-se principalmente por difusão, pelo menos até atingir o ar de fora, onde a convecção (uma forma de fluxo de massa) torna-se dominante.

- Quando a água é transportada através de membranas, a força propulsora é a diferença de potencial hídrico através da membrana. Tal fluxo osmótico ocorre quando as células absorvem a água e quando as raízes transportam água do solo ao xilema.

Em todas as situações citadas, *a água move-se em direção a regiões de baixo potencial hídrico ou de baixa energia livre.* O fenômeno é ilustrado na Figura 4.16, que mostra valores representativos de potencial hídrico e seus componentes, em vários pontos ao longo da rota de transporte de água.

O potencial hídrico decresce continuamente do solo até as folhas. No entanto, os componentes do potencial hídrico podem ser bem diferentes em distintas partes da rota. Por exemplo, dentro das células da folha, como no mesofilo, o potencial hídrico é aproximadamente o mesmo que no xilema vizinho, mas, mesmo assim, os componentes do Ψ_w são bem diferentes. O componente dominante do Ψ_w no xilema é a pressão negativa (Ψ_p), enquanto que na célula foliar Ψ_p é geralmente positivo. Essas grandes diferenças em Ψ_p ocorrem através das membranas plasmáticas das células da folha. Dentro das células foliares, o potencial hídrico é reduzido por um alta concentração de solutos dissolvidos (baixo Ψ_s).

RESUMO

A água é o meio essencial para a vida. As plantas terrestres enfrentam dessecação potencialmente letal pela perda de água para a atmosfera. O problema é agravado pela ampla área de superfície das folhas, alto ganho de energia radiante das mesmas e necessidade de ter uma rota aberta para a absorção de CO_2. Assim, existe um conflito entre a necessidade de conservação de água e a necessidade de assimilação de CO_2.

A necessidade de resolver o conflito vital determina boa parte da estrutura da planta: (1) um sistema radicular extenso para extrair água do solo; (2) uma rota de baixa resistência por meio de elementos de vaso e traqueídes para trazer a água até as folhas; (3) uma cutícula hidrofóbica cobrindo as superfícies da planta para reduzir a evaporação; (4) estômatos microscópicos na superfície foliar para permitir trocas gasosas; e (5) células-guarda para regular o diâmetro (e resistência à difusão) da abertura estomática.

O resultado é um organismo que transporta água do solo à atmosfera puramente em resposta a forças físicas. Nenhuma energia é despendida diretamente pela planta para translocar água, embora o desenvolvimento e a manutenção das estruturas neces-

20 m

Localização	Potencial hídrico e seus componentes (em MPa)				
	Potencial hídrico (Ψ_w)	Pressão (Ψ_p)	Potencial osmótico (Ψ_s)	Gravidade (Ψ_g)	Potencial hídrico na fase gasosa $\left(\frac{RT}{\bar{V}_w} \ln [RH]\right)$
Ar externo (umidade relativa = 50%)	−95,2				−95,2
Espaços intercelulares da folha	−0,8				−0,8
Parede celular do mesofilo (a 10 m)	−0,8	−0,7	−0,2	0,1	
Vacúolo do mesofilo (a 10 m)	−0,8	0,2	−1,1	0,1	
Xilema foliar (a 10 m)	−0,8	−0,8	−0,1	0,1	
Xilema radicular (perto da superfície)	−0,6	−0,5	−0,1	0,0	
Vacúolo de célula radicular (perto da superfície)	−0,6	0,5	−1,1	0,0	
Solo adjacente à raiz	−0,5	−0,4	−0,1	0,0	
Solo a 10 mm da raiz	−0,3	−0,2	−0,1	0,0	

FIGURA 4.16 Visão geral representativa do potencial hídrico e seus componentes em vários pontos ao longo da rota de transporte do solo, por meio da planta para a atmosfera. O potencial hídrico (Ψ_w) pode ser medido ao longo deste *continuum*, mas os componentes variam. Na parte líquida do transporte, pressão (Ψ_p), potencial osmótico (Ψ_s) e gravidade (Ψ_g) determinam Ψ_w. No ar, somente a umidade relativa ($RT/\bar{V}_w \times \ln[RH]$) é importante. Observe que, embora o potencial hídrico seja o mesmo no vacúolo de células do mesofilo e na parede celular circundante, os componentes do Ψ_w podem variar bastante (por exemplo, nesse caso Ψ_p é 0,2 MPa no interior da célula do mesofilo e -0,7 MPa fora) (Nobel, 1999).

sárias para um transporte de água eficiente e controlado requeiram acréscimo considerável de energia.

Os mecanismos de transporte de água do solo, através do corpo da planta para a atmosfera, incluem difusão, fluxo de massa e osmose. Cada um desses processos está associado a diferentes forças propulsoras.

A água na planta pode ser considerada como um sistema hidráulico contínuo, conectando a água no solo ao vapor de água na atmosfera. A transpiração é regulada principalmente pelas células-guarda, as quais regulam o tamanho do poro estomático para atender a demanda fotossintética de aquisição de CO_2, enquanto minimizam a perda de água para a atmosfera. A evaporação de água das paredes celulares das células do mesofilo foliar gera grandes pressões negativas (ou tensões) na água apoplástica. Tais pressões negativas são transmitidas ao xilema e puxam a água por meio dos longos condutos do xilema.

Embora aspectos da teoria coesão-tensão de ascensão da seiva sejam periodicamente debatidos, uma grande quantidade de evidências sustenta a idéia de que o transporte de água no xilema é governado por gradientes de pressão. Quando a transpiração é alta, pressões negativas na água do xilema podem causar cavitação (embolias), as quais têm condições de bloquear o transporte de água no xilema e conduzir a déficits hídricos severos na folha. Déficits hídricos são comuns em plantas, necessitando de uma gama de respostas adaptativas que modificam a fisiologia e o desenvolvimento das plantas.

Material da Internet

Tópicos da Internet

4.1 Irrigação
Uma discussão sobre métodos de irrigação amplamente utilizados e seus impactos na produção de culturas e na salinidade do solo.

4.2 Condutividade hidráulica do solo e potencial hídrico
A condutividade hidráulica do solo determina a facilidade com que a água se move-se por seu intermédio, estando intimamente relacionada ao seu potencial hídrico.

4.3 Condutância hidráulica da raiz
Uma discussão sobre a condutância hidráulica radicular e um exemplo de sua quantificação.

4.4 Calculando velocidades de movimento da água no xilema e em células vivas.
Cálculos da velocidade de movimento da água através do xilema, para cima em um tronco de árvore e pela membrana celular em um tecido e suas implicações para o mecanismo de transporte de água.

4.5 Transpiração foliar e gradientes de vapor de água
Uma análise da transpiração foliar e condutância estomática e suas relações com concentrações de vapor de água na folha e no ar.

Ensaios da Internet

4.1 Um breve histórico do estudo do movimento de água no xilema
A história da compreensão que se tem sobre ascensão da seiva em plantas, especialmente em árvores, é um belo exemplo de como o conhecimento sobre as plantas é adquirido.

4.2 A teoria coesão-tensão em funcionamento
Uma discussão detalhada da teoria coesão-tensão de ascensão da seiva em plantas e algumas explicações alternativas.

4.3 Como a água escala até o topo de uma árvore de 112 m de altura
Medidas de fotossíntese e transpiração em árvores de 112 m de altura mostram que algumas das condições às quais a folhagem do topo é submetida comparam-se àquelas de desertos extremos.

4.4 Cavitação e reenchimento
Um possível mecanismo de reparo da cavitação está sob ativa investigação.

Referências bibliográficas

Balling, A., and Zimmermann, U. (1990) Comparative measurements of the xylem pressure of *Nicotiana* plants by means of the pressure bomb and pressure probe. *Planta* 182: 32,-338.

Bange, G. G. J. (1953) On the quantitative explanation of stomatal transpiration. *Acta Botanica Neerlandica* 2: 255-296.

Canny M. J. (1998) Transporting water in plants. *Am. Sci.* 86:152-159.

Davis, S. D., Sperry, J. S., and Hacke, U. G. (1999) The relationship between xylem conduit diameter and cavitation caused by freezing. *Am. J. Bot.* 86:1367-1372.

Esau, K. (1953) *Plant Anatomy*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Frensch, J., Hsiao, T. C., and Steudle, E. (1996) Water and solute transport along developing maize roots. *Planta* 198: 348-355.

Hacke, U. G., Stiller, V, Sperry, J. S., Pittermann, J., and McCulloh, K. A. (2001) Cavitation fatigue: Embolism and refilling cycles can weaken the cavitation resistance of xylem. *Plant* Physiol. 125: 779-786.

Holbrook, N. M., Ahrens, E. T., Bums, M. J., and Zwieniecki, M. A. (2001) In vivo observation of cavitation and embolism repair using magnetic resonance imaging. *Plant Physiol.* 126: 27-31.

Holbrook, N. M., Bums, M. J., and Field, C. B. (1995) Negative xylem pressures in plants: A test of the balancing pressure technique. *Science* 270: 1193-1194.

Jackson, G. E., Irvine, J., and Grace, J. (1999) Xylem acoustic emissions and water relations of *Calluna vulgaris* L. at two climatological regions of Britain. *Plant Ecol.* 140: 3-14.

Jarvis, P G., and Mansfield, T. A. (1981) *Stomatal Physiology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Jensen, C. R., Mogensen, V O., Poulsen, H.-H., Henson, I. E., Aagot, S., Hansen, E., Ali, M., and Wollenweber, B. (1998) Soil water matric potential rather than water content determines drought responses in field-grown lupin *(Lupinus angustifolius). Aust. J. Plant Physiol.* 25: 353-363.

Kramer, P J., and Boyer, J. S. (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego, CA.

Meidner, H., and Mansfield, D. (1968) *Stomatal Physiology*. McGrawHill, London.

Capítulo

5

Nutrição mineral

NUTRIENTES MINERAIS SÃO ELEMENTOS obtidos principalmente na forma de íons inorgânicos do solo. Apesar desses nutrientes continuamente circularem por todos os organismos, eles entram na biosfera predominantemente pelos sistemas radiculares das plantas; assim, as plantas, de certa forma, agem como "mineradoras" da crosta terrestre (Epstein, 1999). A grande área de superfície das raízes e a capacidade das mesmas em absorver íons inorgânicos em baixas concentrações da solução do solo fazem da absorção mineral pelas plantas um processo muito eficaz. Após terem sido absorvidos pelas raízes, tais elementos são translocados para as diversas partes da planta, onde são utilizados em numerosas funções biológicas. Outros organismos, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio, geralmente participam com as raízes da obtenção de nutrientes.

O estudo do modo como as plantas obtêm e utilizam os nutrientes minerais é chamado de **nutrição mineral**. Essa área de pesquisa é fundamental tanto para a agricultura moderna quanto para a proteção ambiental. Altas produtividades agrícolas dependem em grande escala da fertilização com minerais. Na verdade, a produtividade da maioria das culturas agrícolas aumenta linearmente com a quantidade de fertilizantes que absorvem (Loomis e Conner, 1992). Para atender à crescente demanda por alimento, o consumo mundial dos principais elementos minerais fertilizantes — nitrogênio, fósforo e potássio — aumentou continuamente de 112 milhões de toneladas métricas em 1980 para 143 milhões de toneladas métricas em 1990, permanecendo constante ao longo desta última década.

Entretanto, plantas assim cultivadas utilizam menos de metade do fertilizante aplicado (Loomis e Conner, 1992). Os minerais restantes podem lixiviar para águas superficiais ou subterrâneas, permanecer aderidos às partículas de solo ou contribuir para a poluição atmosférica. Como conseqüência da lixiviação de fertilizantes, muitos poços de água nos Estados Unidos não satisfazem mais aos padrões federais de concentração de nitratos em água potável (Nolan e Stoner, 2000). Considerando sob um ângulo mais positivo, as plantas são a via tradicional de reciclagem de restos animais e estão se mostrando úteis na remoção de minerais deletérios de lixões tóxicos (Macek e cols., 2000). Devido à natureza complexa da relação planta-solo-atmosfera, estudos na área de nutrição mineral envolvem químicos que estudam a atmosfera, pedologistas, hidrologistas, microbiologistas e ecologistas, além de fisiologistas vegetais.

Neste capítulo, serão discutidos, primeiro, as necessidades nutricionais das plantas, os sintomas de deficiências nutricionais específicas e o uso de fertilizantes para garantir a elas uma nutrição adequada. Depois, será examinado como o solo e a estrutura radicular influenciam a transferência de nutrientes inorgânicos do ambiente para dentro da planta. Finalmente, introduziremos o tópico de associações micorrízicas. Os Capítulos 6 e 12 abordam aspectos adicionais do transporte de solutos e da assimilação de nutrientes, respectivamente.

NUTRIENTES ESSENCIAIS, DEFICIÊNCIAS E DISTÚRBIOS VEGETAIS

Apenas certos elementos foram determinados como essenciais para o crescimento vegetal. Um **elemento essencial** é definido como aquele cuja ausência impede uma planta de completar seu ciclo de vida (Arnon e Stout, 1939) ou aquele que tem um papel fisiológico claro (Epstein, 1999). Se as plantas recebem esses elementos, assim como energia da luz solar, elas podem sintetizar todos os compostos de que necessitam para um crescimento normal. A Tabela 5.1 apresenta os elementos que são considerados essenciais para a maioria das plantas superiores, senão para todas. Os primeiros três elementos — hidrogênio, carbono e oxigênio — não são considerados nutrientes minerais porque são obtidos primariamente da água ou do dióxido de carbono.

Os elementos minerais essenciais são geralmente classificados como macro ou micronutrientes, de acordo com suas concentrações relativas no tecido vegetal. Em alguns casos, as diferenças na concentração de macro e de micronutrientes no tecido vegetal não são tão grandes como as indicadas na Tabela 5.1. Por exemplo, alguns tecidos vegetais, como o mesofilo, têm quase tanto ferro e manganês quanto enxofre e magnésio. Muitos elementos estão normalmente presentes em concentrações maiores do que as necessidades mínimas dos vegetais.

Alguns pesquisadores têm argumentado que a classificação em macronutrientes e micronutrientes é difícil de ser justificada do ponto de vista fisiológico. Mengel e Kirkby (1987) propuseram que, em vez disto, os elementos essenciais sejam classificados de acordo com seu papel bioquímico e sua função fisiológica. A Tabela 5.2 mostra essa classificação, na qual os nutrientes vegetais foram divididos em quatro grupos básicos:

1. O primeiro grupo de elementos essenciais é formado pelos compostos orgânicos (com carbono) das plantas. As plantas assimilam esses nutrientes por meio de reações bioquímicas envolvendo oxidações e reduções.
2. O segundo grupo é importante em reações de armazenagem de energia ou na manutenção da integridade estrutural. Os

TABELA 5.1
Níveis adequados no tecido de elementos que podem ser requeridos pela plantas

Elemento	Símbolo químico	Concentração na matéria seca (% ou ppm)[a]	Número relativo de átomos em relação ao molibdênio
Obtidos da água ou dióxido de carbono			
Hidrogênio	H	6	60.000.000
Carbono	C	45	40.000.000
Oxigênio	O	45	30.000.000
Obtidos do solo			
Macronutrientes			
Nitrogênio	N	1,5	1.000.000
Potássio	K	1,0	250.000
Cálcio	Ca	0,5	125.000
Magnésio	Mg	0,2	80.000
Fósforo	P	0,2	60.000
Enxofre	S	0,1	30.000
Silício	Si	0,1	30.000
Micronutrientes			
Cloro	Cl	100	3.000
Ferro	Fe	100	2.000
Boro	B	20	2.000
Manganês	Mn	50	1.000
Sódio	Na	10	400
Zinco	Zn	20	300
Cobre	Cu	6	100
Níquel	Ni	0,1	2
Molibdênio	Mo	0,1	1

Fonte: Segundo Epstein 1972, 1999.
[a]Os valores para os elementos não-minerais (H, C, O) e para os macronutrientes são porcentagens. Os valores para micronutrientes são expressos em partes por milhão.

TABELA 5.2
Classificação dos nutrientes minerais das plantas de acordo com a função bioquímica

Nutriente mineral	Funções
Grupo 1	**Nutrientes que fazem parte de compostos de carbono**
N	Constituinte de aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, coenzimas, hexoaminas, etc.
S	Componente da cisteína, cistina, metionina e proteínas. Constituinte do ácido lipóico, coenzima A, tiamina pirofosfato, glutationa, biotina, adenosina-5'-fosfossulfato e 3-fosfoadenosina.
Grupo 2	**Nutrientes que são importantes na armazenagem de energia e na integridade estrutural**
P	Componentes de fosfato açúcares, ácidos nucléicos, nucleotídeos, coenzimas, fosfolipídeos, ácido fítico, etc. Tem papel central em reações que envolvem ATP.
Si	Depositado como sílica amorfa em paredes celulares. Contribui para as propriedades mecânicas das paredes celulares, incluindo rigidez e elasticidade.
B	Complexos com manitol, manans, ácido polimanurônico e outros constituintes das paredes celulares. Envolvido no alongamento celular e no metabolismo de ácidos nucléicos.
Grupo 3	**Nutrientes que permanecem na forma iônica**
K	Requerido como cofator de mais de 40 enzimas. Principal cátion no estabelecimento do turgor celular e manutenção da eletroneutralidade celular.
Ca	Constituinte da lamela média das paredes celulares. Requerido como cofator por algumas enzimas envolvidas na hidrólise de ATP e de fosfolipídeos. Atua como mensageiro secundário na regulação metabólica.
Mg	Requerido por muitas enzimas envolvidas na transferência de fosfatos. Constituinte da molécula de clorofila.
Cl	Requerido para as reações fotossintéticas envolvendo a evolução de O_2
Mn	Requerido para a atividade de algumas desidrogenases, descarboxilases, quinases, oxidases e peroxidases. Envolvido com outras enzimas ativadas por cátions e na evolução fotossintética de O_2
Na	Envolvido na regeneração do fosfoenolpiruvato em plantas C_4 e CAM. Substitui o potássio em algumas funções.
Grupo 4	**Nutrientes que estão envolvidos em rações redox**
Fé	Constituinte de citocromos e ferro-proteínas não-heme envolvidas na fotossíntese, fixação de N_2 e respiração.
Zn	Constituinte da álcool desidrogenase, desidrogenase glutâmica, anidrase carbônica, etc.
Cu	Componente da ácido ascórbico oxidase, tirosinase, monoamina oxidase, uricase, citocromo oxidase, fenolase, lacase e plastocianina.
Ni	Constituinte da urease. Em bactérias fixadoras de N_2, é constituinte de hidrogenases.
Mo	Constituinte da nitrogenase, nitrato redutase e xantina desidrogenase.

Fonte: Segundo Evans e Sorger, 1966, e Mengel e Kirkby, 1987.

elementos deste grupo estão comumente presentes em tecidos vegetais sob forma de fosfato, borato e ésteres silicato, em que o grupo elementar está ligado ao grupo hidroxila de uma molécula orgânica (i. é, açúcar-fosfato).

3. O terceiro grupo está presente no tecido vegetal como íons livres ou ligados a substâncias tais como ácidos pécticos, presentes na parede celular vegetal. De especial importância são seus papéis como cofatores enzimáticos e na regulação de potenciais osmóticos.

4. O quarto grupo desempenha importantes funções em reações envolvendo transporte de elétrons.

Elementos de ocorrência natural, diferentes dos mostrados na Tabela 5.1, também podem se acumular nos tecidos vegetais. Por exemplo, o alumínio não é considerado um elemento essencial, mas as plantas normalmente contêm de 0,1 a 500 ppm de alumínio, assim como a adição de baixos níveis deste elemento a uma solução nutritiva pode estimular o crescimento vegetal (Marschner, 1995). Muitas espécies dos gêneros *Astragalus*, *Xylorhiza* e *Stanleya* acumulam selênio, embora as plantas não tenham mostrado uma necessidade específica deste elemento.

O cobalto é parte da cobalamina (vitamina B_{12} e seus derivados), um componente de várias enzimas em microrganismos fixadores de nitrogênio. Assim, a deficiência de cobalto bloqueia o desenvolvimento e função dos nódulos de fixação de nitrogênio. No entanto, plantas que não fixam nitrogênio, assim como plantas que o fixam e que são supridas com amônio ou nitrato, não necessitam de cobalto. Plantas cultivadas normalmente contêm apenas quantidades relativamente pequenas de elementos não-essenciais.

Técnicas especiais são utilizadas em estudos nutricionais

Demonstrar que um elemento é essencial exige que as plantas sejam cultivadas sob condições experimentais nas quais apenas o elemento sob investigação encontra-se ausente. Tais condições são extremamente difíceis de alcançar com plantas cultivadas em meio complexo como solo. No século XIX, vários pesquisadores, incluindo Nicolas-Théodore de Saussure, Julius von Sachs, Jean-Baptiste-Joseph-Dieudonné Boussingault e Whilhelm Knop abordaram o problema, cultivando plantas com as raízes imersas em uma **solução nutritiva** contendo apenas sais inorgânicos. A demonstração de que as plantas podiam crescer normalmente sem solo ou matéria orgânica provou, inequivocamente, que as plantas podem satisfazer suas necessidades usando apenas elementos inorgânicos e a luz solar.

A técnica de cultivar plantas com suas raízes imersas em solução nutritiva sem solo é chamada de cultivo em solução ou **hidroponia** (Gericke, 1937). Cultivo hidropônico bem-sucedido (Figura 5.1A) exige um grande volume de solução nutritiva ou ajuste fre-

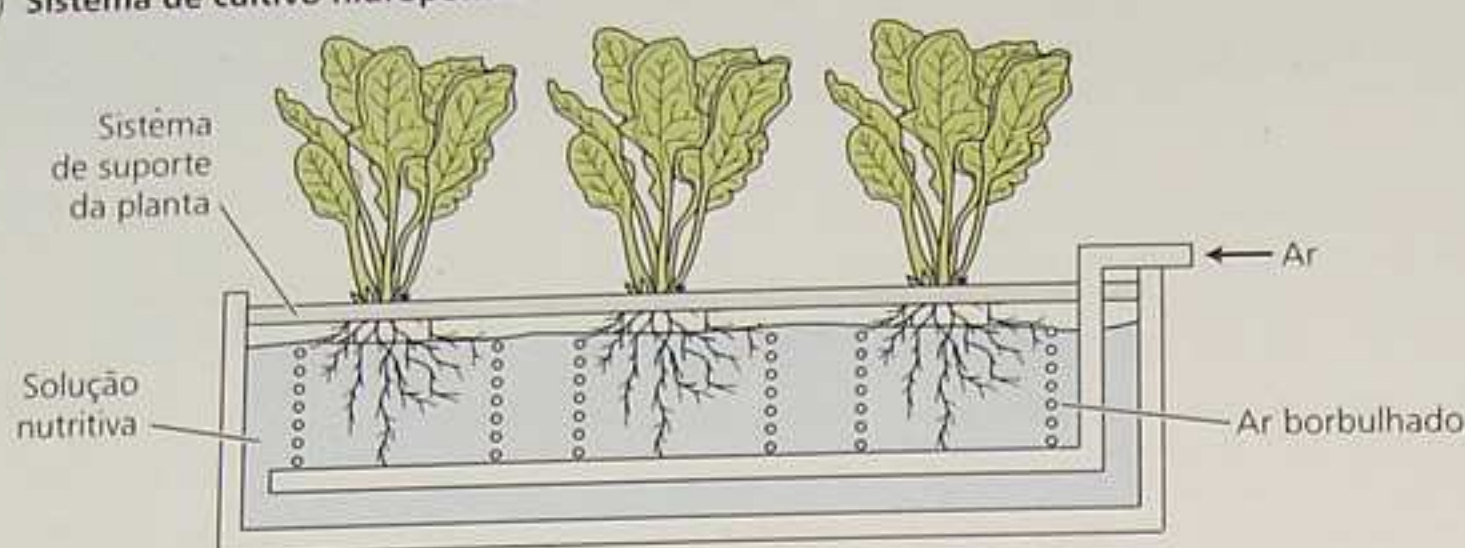



FIGURA 5.1 Sistemas hidropônicos e aeropônicos de cultivo de plantas em soluções nutritivas, nas quais a composição e o pH podem ser automaticamente controlados. (A) Em um sistema hidropônico, as raízes são imersas em solução nutritiva e o ar é borbulhado através da solução. (B) Um sistema hidropônico alternativo, freqüentemente usado em produção comercial é o de cultivo em lâmina de nutrientes, no qual a solução nutritiva é bombeada na forma de uma fina lâmina ao longo de uma canaleta rasa, banhando as raízes das plantas. Nesse sistema, a composição e o pH da solução nutritiva podem ser controlados automaticamente. (C) No sistema aeropônico, as raízes são suspensas acima da solução nutritiva, a qual é turbilhonada por um rotor motorizado gerando um *spray* (C segundo Weathers e Zobel, 1992).

qüente da solução nutritiva, para impedir que a absorção de nutrientes pelas raízes produza mudanças radicais nas concentrações dos nutrientes e no pH do meio. Um suprimento satisfatório de oxigênio ao sistema radicular — também crítico — pode ser alcançado borbulhando-se vigorosamente ar pelo meio.

A hidroponia é utilizada na produção comercial de muitas plantas cultivadas em estufas. Em uma das formas de cultivo hidropônico comercial, elas são cultivadas em um material de suporte, como areia, brita, vermiculita ou argila expandida. Soluções nutritivas circulam, então, através do material de suporte e as soluções velhas são removidas por lixiviação. Em outra forma de cultura hidropônica, as raízes das plantas são depositadas sobre uma canaleta e as soluções nutritivas fluem em uma fina camada ao longo da canaleta, sobre as raízes (Cooper, 1979, Asher e Edwards, 1983). Esse **sistema de cultivo em lâmina de nutrientes** assegura que as raízes recebam um amplo suprimento de oxigênio (Figura 5.1B).

Uma outra alternativa, muitas vezes proclamada como o meio do futuro é cultivar as plantas de maneira **aeropônica** (Weathers e Zobel, 1992). Nessa técnica, cultivam-se as plantas com suas raízes suspensas no ar, enquanto são aspergidas continuamente com uma solução nutritiva (Figura 5.1C), abordagem que proporciona fácil manipulação do ambiente gasoso ao redor das raízes, mas requer maiores concentrações de nutrientes do que o cultivo hidropônico, para sustentar um rápido crescimento vegetal. Por essa razão e em decorrência de outras dificuldades técnicas, o uso de aeroponia não está amplamente disseminado.

Soluções nutritivas podem sustentar rápido crescimento vegetal

Ao longo dos anos, muitas formulações têm sido empregadas para as soluções nutritivas. As primeiras formulações desenvolvidas por Knop, na Alemanha, incluíam somente KNO_3, $Ca(NO_3)_2$, KH_2PO_4, $MgSO_4$ e um sal de ferro. Naquela época, acreditava-se que tal solução nutritiva continha todos os minerais exigidos pelas plantas, mas aqueles experimentos foram conduzidos com produtos químicos contaminados com outros elementos, hoje reconhecidos como essenciais (como boro ou molibdênio). A Tabela 5.3 apresenta uma formulação mais moderna para uma solução nutritiva, a qual é chamada de solução de Hoagland modificada, denominação em homenagem a Dennis R. Hoagland, um estudioso que se destacou pelo desenvolvimento de pesquisas modernas em nutrição mineral nos Estados Unidos.

Uma solução de Hoagland modificada contém todos os elementos minerais que se sabe serem necessários ao rápido crescimento das plantas. As concentrações desses elementos são

TABELA 5.3
Composição de uma solução de Hoagland modificada para cultivo de plantas

Composto	Peso molecular	Concentração da solução-estoque	Concentração da solução-estoque	Volume de solução-estoque por volume final de solução	Elemento	Concentração final do elemento	
	g mol^{-1}	MM	g L^{-1}	mL		μM	ppm
Macronutrientes							
KNO_3	101,10	1.000	101,10	6,0	N	16.000	224
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,16	1.000	236,16	4,0	K	6.000	235
$NH_4H_2PO_4$	115,08	1.000	115,08	2,0	Ca	4.000	160
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,48	1.000	246,49	1,0	P	2.000	62
					S	1.000	32
					Mg	1.000	24
Micronutrientes							
KCl	74,55	25	1,864	2,0 (KCl a H_2MoO_4)	Cl	50	1,77
H_3BO_3	61,83	12,5	0,773		B	25	0,27
$MnSO_4 \cdot H_2O$	169,01	1,0	0,169		M	2,0	0,11
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,54	1,0	0,288		Zn	2,0	0,13
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249,68	0,25	0,062		Cu	0,5	0,03
H_2MoO_4 (85% MoO_3)	161,97	0,25	0,040		Mo	0,5	0,05
NaFeDTPA (10%Fe)	468,20	64	30,0	0,3-1,0	Fe	16,1-53,7	1,00-3,00
Opcional[a]							
$NiSO_4 \cdot 6H_2O$	262,86	0,25	0,066	2,0	Ni	0,5	0,03
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	284,20	1.000	284,20	1,0	Si	1.000	28

Fonte: Segundo Epstein, 1972.
Nota: Os macronutrientes são adicionados separadamente a partir das soluções-estoque para impedir a precipitação durante o preparo da solução-nutritiva. Uma solução estoque mista é preparada contendo todos os micronutrientes, exceto o ferro. O ferro é adicionado como dietilenotriaminapentacetato férrico de sódio (NFeDTPA, nome comercial Ciba-Geigy Sequestreno 330 Fe; ver Figura 5.2); algumas plantas, como o milho, requerem os níveis mais elevados de ferro mostrados na tabela.
[a]O níquel está usualmente presente como contaminante de outros produtos químicos, de forma que ele pode não precisar ser aplicado de forma explícita. O silício, se incluído, deveria ser adicionado primeiro e, então, ajustado o pH com HCl para impedir a precipitação de outros nutrientes.

estabelecidas no maior nível possível, sem produzir sintomas de toxicidade ou estresse salino e, assim, podem ser várias ordens de magnitude maiores do que as encontradas no solo ao redor das raízes. Por exemplo, enquanto o fósforo está presente na solução do solo em concentrações normalmente menores do que 0,06 ppm, na solução nutritiva ele é oferecido a 62 ppm (Epstein, 1972). Tais níveis iniciais altos permitem às plantas crescerem no meio por períodos prolongados sem reposição dos nutrientes. Muitos pesquisadores, no entanto, diluem suas soluções nutritivas em muitas vezes e as trocam com freqüência para minimizar as flutuações na concentração de nutrientes no meio e no tecido vegetal.

Uma outra propriedade importante da formulação de Hoagland modificada é que o nitrogênio é suprido tanto na forma de amônio (NH_4^+) quanto de nitrato (NO_3^-). Suprir nitrogênio em mistura balanceada de cátions e ânions tende a reduzir o rápido aumento no pH do meio, que é comumente observado quando o nitrogênio é fornecido apenas na forma do ânion nitrato (Asher e Edwards, 1983). Mesmo quando o pH do meio é mantido neutro, a maioria da plantas cresce melhor se tiver acesso tanto a NH_4^+ quanto a NO_3^-, pois a absorção e a assimilação das duas formas de nitrogênio promovem um balanço cátion-ânion dentro da planta (Raven e Smith, 1976; Bloom, 1994).

Um problema significativo das soluções nutritivas é a manutenção da disponibilidade de ferro. Quando fornecido na forma de um sal inorgânico como $FeSO_4$ ou $Fe(NO_3)_2$, o ferro pode precipitar da solução como hidróxido de ferro. Se sais fosfato estão presentes, fosfato de ferro insolúvel também será formado. A precipitação do ferro na solução torna-o fisicamente indisponível à planta, a não ser que sais de ferro sejam adicionados com freqüência. Pesquisadores mais antigos abordaram o problema adicionando ferro junto com ácido cítrico ou tartárico. Compostos como esses são chamados de **quelantes**, pois formam complexos solúveis com cátions, como ferro e cálcio, nos quais o cátion é retido por forças iônicas, e não por ligações covalentes. Cátions que formam quelatos são, então, fisicamente mais disponíveis às plantas.

Soluções nutritivas mais modernas usam os produtos químicos ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) ou ácido dietilenotriaminapentacético (DTPA ou ácido pentético) como agentes quelantes (Sievers e Bailar, 1962). A Figura 5.2 mostra a estrutura do DTPA. O destino do quelato durante a absorção do ferro pelas células radiculares não é claro; o ferro pode ser liberado do quelante quando é reduzido de Fe^{3+} a Fe^{2+} na superfície radicular. O quelante pode difundir-se de volta à solução nutritiva (ou do solo) e reagir com outro íon Fe^{3+} ou com outros íons metálicos. Após a absorção, o ferro é mantido solúvel por formação de quelatos com compostos orgânicos presentes nas células vegetais. O ácido cítrico pode desempenhar um papel importante na formação de quelatos com ferro e no transporte de longa distância do mesmo no xilema.

Deficiências minerais perturbam o metabolismo e o funcionamento vegetal

O suprimento inadequado de um elemento essencial resulta em um distúrbio nutricional que se manifesta por sintomas de deficiência característicos. Em cultivo hidropônico, a remoção de um elemento essencial pode ser prontamente correlacionada a um determinado conjunto de sintomas, quando as deficiências são agudas. O diagnóstico de plantas que crescem em solo pode ser mais complexo pelos seguintes motivos:

- Tanto deficiências crônicas quanto agudas de vários elementos podem ocorrer simultaneamente.
- Deficiência ou quantidades excessivas de um elemento podem induzir deficiências ou acúmulos excessivo de outro elemento.
- Algumas doenças virais das plantas podem produzir sintomas similares àqueles das deficiências nutricionais.

Sintomas de deficiência nutricional em plantas são a expressão de distúrbios metabólicos resultantes do suprimento insuficiente de um elemento essencial. Tais problemas estão relacionados às funções desempenhadas pelos elementos essenciais no metabolismo e funcionamento normais da planta. A Tabela 5.2 exibe algumas das funções dos elementos essenciais.

Embora cada elemento essencial participe de muitas reações metabólicas diferentes, algumas generalizações a respeito das funções dos elementos essenciais no metabolismo vegetal são possíveis. Em geral, os elementos essenciais atuam na estrutura do vegetal, no seu metabolismo e na osmorregulação das células vegetais. Papéis mais específicos podem estar relacionados à capacidade de cátions divalentes, como cálcio ou magnésio, de modificar a permeabilidade das membranas vegetais. Além disso, pesquisas continuam a revelar papéis específicos desses elementos no metabolismo das plantas; por exemplo, o cálcio age como um sinal na regulação de enzimas-chave no citosol (Hepler e Wayne, 1985; Sanders e cols., 1999). Assim, a maioria dos elementos essenciais tem múltiplas funções no metabolismo vegetal.

Quando os sintomas de deficiência aguda são relacionados a um elemento essencial em particular, uma pista importante é a extensão em que um elemento pode ser reciclado de folhas mais velhas para folhas mais jovens. Alguns elementos, como nitrogênio, fósforo e potássio, podem prontamente mover-se de folha para folha; outros, como boro, ferro e cálcio, são relativamente imóveis na maioria das espécies vegetais (Tabela 5.4). Se um elemento essencial é móvel, sintomas de deficiência tendem a aparecer primeiro nas folhas mais velhas. A deficiência de um elemento essencial imóvel vai tornar-se evidente primeiro em folhas mais jovens. Embora os mecanismos precisos de mobilização de nutrientes não sejam bem-compreendidos, hormônios vegetais, como citocininas, por exemplo, parecem estar envolvidos (ver Capítulo 21). Na discussão a seguir, serão descritos os sintomas de deficiências específicos e os papéis funcionais para os elementos essenciais, da maneira como eles se encontram agrupados na Tabela 5.2.

Grupo 1: Deficiências de nutrientes minerais que integram compostos de carbono. Este primeiro grupo consiste de nitrogênio e enxofre. A disponibilidade de nitrogênio em solos limita a produtividade das plantas na maioria dos ecossistemas naturais e agrícolas. Por outro lado, os solos geralmente contêm enxofre em excesso. No entanto, nitrogênio e enxofre têm em comum a propriedade de que seus estados de oxidação-redução variam amplamente (ver Capítulo 12). Algumas das reações mais intensas energeticamente na vida convertem formas inorgânicas altamente oxidadas, absorvidas do solo, em formas altamente reduzidas, encontradas em compostos orgânicos como aminoácidos.

NITROGÊNIO. O nitrogênio é o elemento mineral que as plantas exigem em maiores quantidades. Ele serve como constituinte de muitos componentes da célula vegetal, incluindo aminoácidos e

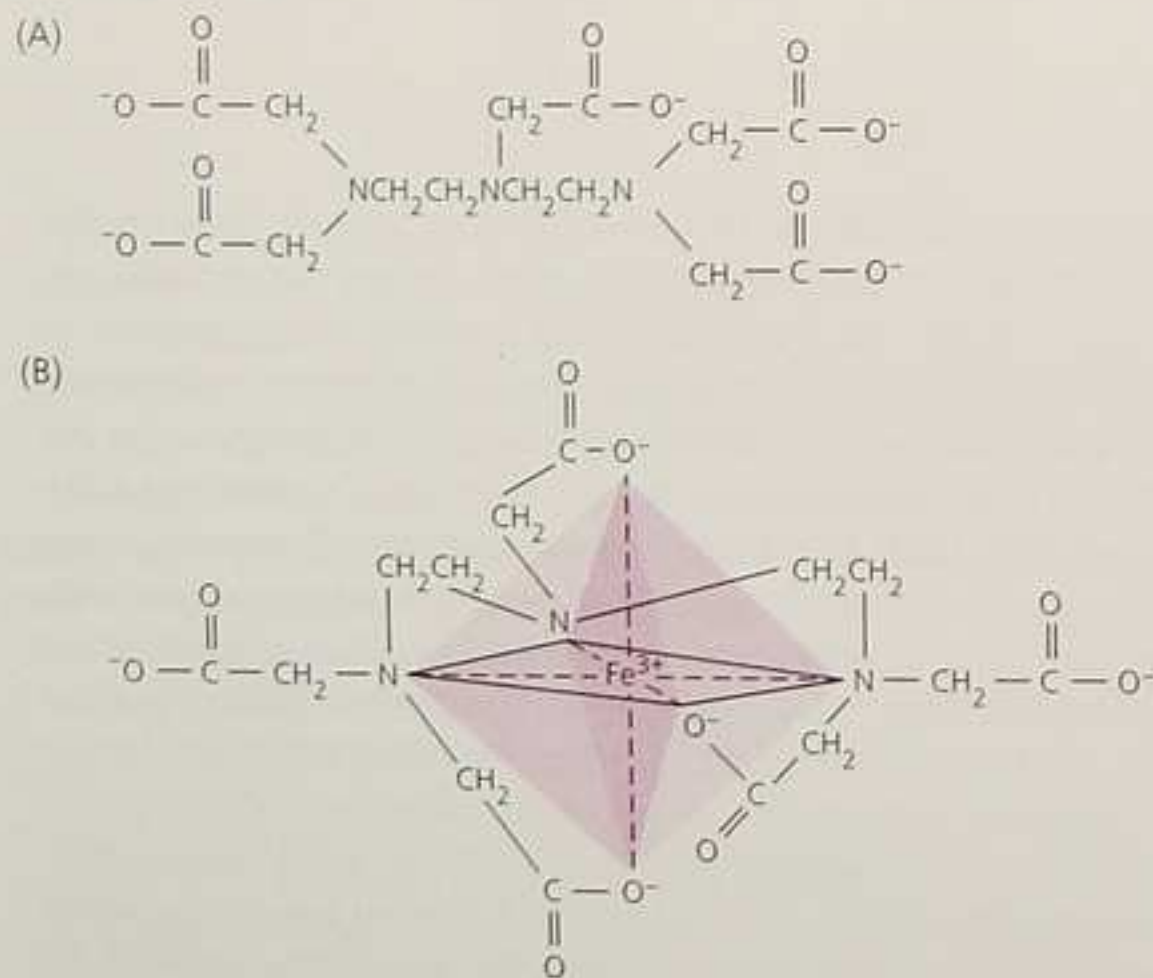



FIGURA 5.2 Estrutura química do quelante DTPA isolado (A) ou formando quelato com um íon Fe^{3+} (B) o ferro liga-se ao DTPA pela interação com três átomos de nitrogênio e com os três átomos de oxigênio ionizados dos grupos carboxilato (Sievers e Bailar, 1962). A estrutura de anel resultante envolve o íon metálico e efetivamente neutraliza sua reatividade na solução. Durante a absorção de ferro na superfície radicular, o Fe^{3+} parece ser reduzido a Fe^{2+}, que é liberado do complexo DTPA-ferro. O quelante pode ligar-se a outros íons Fe^{3+} disponíveis.

TABELA 5.4
Elementos minerais classificados com base em suas mobilidades dentro da planta e suas tendências de translocação durante deficiências

Móveis	Imóveis
Nitrogênio	Cálcio
Potássio	Enxofre
Magnésio	Ferro
Fósforo	Boro
Cloro	Cobre
Sódio	
Zinco	
Molibdênio	

Nota: Elementos listados na ordem de suas abundâncias na planta.

ácidos nucléicos. Portanto, a deficiência de nitrogênio rapidamente inibe o crescimento vegetal. Se tal deficiência persiste, a maioria das espécies mostra **clorose** (amarelecimento das folhas), sobretudo nas folhas mais velhas, próximas à base da planta (para fotografias de deficiência de nitrogênio e de outras deficiências minerais descritas neste capítulo, ver **Tópico 5.1 na Internet**). Sob severa deficiência de nitrogênio, essas folhas tornam-se completamente amarelas (ou castanhas) e caem da planta. Folhas mais jovens podem não mostrar inicialmente tais sintomas, pois é possível que o nitrogênio seja mobilizado a partir das folhas mais velhas. Assim, uma planta deficiente em nitrogênio pode ter folhas superiores verde-claras e folhas inferiores amarelas ou castanhas.

Quando a deficiência de nitrogênio desenvolve-se lentamente, é possível que as plantas tenham caules pronunciadamente delgados e comumente lenhosos. Esse caráter lenhoso pode ser devido a um acúmulo dos carboidratos em excesso, que não podem ser usados na síntese de aminoácidos ou de outros compostos nitrogenados. Os carboidratos não utilizados no metabolismo do nitrogênio podem, entretanto, ser usados na síntese de antocianina, levando ao acúmulo desse pigmento. Essa condição revela-se pela coloração arroxeada de folhas, pecíolos e caules de algumas plantas deficientes em nitrogênio, como tomate e algumas variedades de milho.

ENXOFRE. O enxofre é encontrado em dois aminoácidos e é constituinte de várias coenzimas, além de vitaminas essenciais ao metabolismo. Muitos dos sintomas da deficiência de enxofre são similares aos da deficiência de nitrogênio, incluindo clorose, redução do crescimento e acúmulo de antocianinas. Tal similaridade não surpreende, pois o enxofre e o nitrogênio são constituintes de proteínas. Entretanto, a clorose causada pela deficiência de enxofre aparece, em geral, inicialmente em folhas jovens e maduras, em vez de em folhas velhas, como na deficiência de nitrogênio, porque, ao contrário do nitrogênio, o enxofre não é remobilizado com facilidade para as folhas jovens, na maioria das espécies. No entanto, em muitas espécies vegetais, a clorose por falta de enxofre pode ocorrer simultaneamente em todas as folhas ou até mesmo iniciar nas folhas mais velhas.

Grupo 2: Deficiência em nutrientes minerais que são importantes na armazenagem de energia ou na integridade estrutural. Este grupo consiste de fósforo, silício e boro. Fósforo e silício são encontrados em concentrações no tecido vegetal que lhes garantem a classificação como macronutrientes, enquanto o boro é muito menos abundante e considerado um micronutriente. Esses elementos estão usualmente presentes nas plantas em ligações ésteres a uma molécula e carbono.

FÓSFORO. O fósforo (como fosfato, PO_4^{3-}) é um componente integral de compostos importantes das células vegetais, incluindo fosfato-açúcares, intermediários da respiração e fotossíntese, bem como os fosfolipídeos que compõem as membranas vegetais. É também componente de nucleotídeos utilizados no metabolismo energético das plantas (como ATP) e no DNA e RNA. Sintomas característicos da deficiência de fósforo incluem crescimento reduzido em plantas jovens e uma coloração verde escura das folhas, as quais podem encontrar-se malformadas e conter pequenas manchas de tecido morto, chamadas de **manchas necróticas** (para fotografia, ver **Tópico 5.1 na Internet**).

Da mesma forma que na deficiência de nitrogênio, algumas espécies podem produzir antocianinas em excesso, conferindo às folhas uma coloração levemente arroxeada. Em comparação com a deficiência de nitrogênio, a coloração púrpura gerada pela deficiência de fósforo não está associada à clorose. Na verdade, as folhas podem apresentar uma coloração roxa fortemente esverdeada. Sintomas adicionais da deficiência de fósforo incluem a produção de caules delgados (mas não lenhosos) e a morte das folhas mais velhas. A maturação da planta também pode ser retardada.

SILÍCIO. Apenas membros da família Equisetaceae — chamados *juncos de polimento* (do inglês, *scouring rushes*), porque houve tempo em que suas cinzas, ricas em sílica granulosa, eram usadas para polir panelas — requerem silício para completar seus ciclos de vida. No entanto, muitas outras espécies acumulam quantidades substanciais de silício em seus tecidos e apresentam melhoria no crescimento e na fertilidade, quando supridas com quantidades adequadas de silício (Epstein, 1999).

Plantas deficientes em silício são mais suscetíveis ao acamamento (tombamento) e à infecção fúngica O silício é depositado principalmente no retículo endoplasmático, paredes celulares e espaços intercelulares, como sílica amorfa hidratada ($SiO_2.nH_2O$). Ele também forma complexos com polifenóis e, assim, serve como alternativa à lignina no reforço das paredes celulares. Além disso, o silício pode aliviar a toxicidade de muitos metais pesados.

BORO. Embora o papel preciso do boro no metabolismo vegetal não seja claro, evidências sugerem que ele desempenha funções no alongamento celular, síntese de ácidos nucléicos, respostas hormonais e funcionamento de membranas (Shelp, 1993). Plantas deficientes em boro podem exibir uma ampla variedade de sintomas, dependendo da espécie e da idade da planta.

Um sintoma característico é a necrose preta de folhas jovens e gemas terminais. A necrose das folhas jovens ocorre principalmente na base da lâmina foliar. Os caules ficam anormalmente rígidos e quebradiços. A dominância apical pode ser perdida, tornando a planta altamente ramificada; entretanto, os ápices terminais dos ramos logo se tornam necróticos devido à inibição da divisão celular. Estruturas como frutos, raízes carnosas e tubérculos podem exibir necrose ou anormalidades relacionadas à desintegração de tecidos internos.

Grupo 3: Deficiências de nutrientes minerais que permanecem na forma iônica. Este grupo inclui alguns dos elementos minerais mais familiares: os macronutrientes potássio, cálcio e magnésio e os micronutrientes cloro, manganês e sódio. Eles podem ser encontrados em solução no citosol ou vacúolos ou podem estar ligados eletrostaticamente ou como ligantes a compostos com carbono.

POTÁSSIO. O potássio, presente nas plantas como o cátion K^+, desempenha um importante papel na regulação do potencial osmótico das células vegetais (ver Capítulos 3 e 6). Ele também ativa muitas enzimas envolvidas na respiração e na fotossíntese. O primeiro sintoma visível da deficiência de potássio é clorose em manchas ou marginal, que, então, evolui para necrose, principalmente nos ápices foliares, nas margens e entre nervuras. Em muitas monocotiledôneas, essas lesões necróticas podem formar-se inicialmente nos ápices foliares e margens e, então, estender-se em direção à base.

Como o potássio pode ser remobilizado para folhas mais jovens, esses sintomas aparecem inicialmente nas folhas mais ma-

duras da base da planta. As folhas podem também curvar-se e secar. Os caules de plantas deficientes em potássio podem ser delgados e fracos, com regiões internodais anormalmente curtas. Em milho deficiente em potássio, as raízes podem ter uma suscetibilidade aumentada a fungos da podridão radicular presentes no solo, e essa suscetibilidade, juntamente com os efeitos caulinares, resulta em uma maior tendência de tombamento da planta no solo (acamamento).

CÁLCIO. Os íons cálcio (Ca^{2+}) são utilizados na síntese de novas paredes celulares, em particular a lamela média, que separa células em divisão. O cálcio também é utilizado no fuso mitótico durante a divisão celular. Ele é requerido para o funcionamento normal das membranas vegetais e foi-lhe atribuído o papel de mensageiro secundário em várias respostas da plantas, tanto a sinais ambientais quanto a hormonais (Sanders e cols., 1999). Em sua função como mensageiro secundário, o cálcio pode ligar-se à **calmodulina**, uma proteína encontrada no citosol de células vegetais. O complexo calmodulina-cálcio regula muitos processos metabólicos.

Sintomas característicos da deficiência de cálcio incluem a necrose de regiões meristemáticas jovens, como os ápices radiculares ou folhas jovens, nas quais a divisão celular e a formação de paredes são mais rápidas. A necrose em plantas em lento crescimento pode ser precedida por uma clorose generalizada e um curvamento para baixo das folhas. As folhas jovens também podem parecer deformadas. O sistema radicular de uma planta deficiente em cálcio pode mostrar-se acastanhado, curto e altamente ramificado. Pode haver redução severa no crescimento, se as regiões meristemáticas da planta morrerem prematuramente.

MAGNÉSIO. Em células vegetais, os íons magnésio (Mg^{2+}) têm um papel específico na ativação de enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de DNA e RNA. O magnésio também é parte da estrutura em anel da molécula de clorofila (ver Figura 7.6A). Um sintoma característico da deficiência de magnésio é a clorose entre as nervuras foliares, ocorrendo, primeiro, nas folhas mais velhas por causa da mobilidade de tal elemento. Esse padrão de clorose ocorre porque a clorofila nos feixes vasculares permanece inalterada por períodos mais longos que a clorofila nas células entre os feixes. Se a deficiência é muito grande, as folhas podem tornar-se amarelas ou brancas. Um sintoma adicional da deficiência de magnésio pode ser a abscisão foliar prematura.

CLORO. O elemento cloro é encontrado nas plantas como o íon cloreto (Cl^-). Ele é necessário para as reações de quebra da molécula de água da fotossíntese, pelas quais o oxigênio é produzido (ver Capítulo 7) (Clarke e Eaton-Rye, 2000). Além disso, o cloro pode ser necessário para a divisão celular tanto em folhas quanto em raízes (Harling e cols., 1997). Plantas deficientes em cloro desenvolvem murcha dos ápices foliares, seguida por clorose e necrose generalizadas. As folhas podem também exibir crescimento reduzido. Eventualmente, as folhas podem assumir uma coloração bronzeada ("bronzeamento"). As raízes de plantas deficientes em cloro podem parecer curtas e grossas junto aos ápices radiculares.

Os íons cloreto são muito solúveis e geralmente disponíveis nos solo porque a água do mar é carregada para o ar pelo vento e distribuída sobre o solo quando chove. Portanto, a deficiência de cloro é desconhecida nas plantas que crescem em hábitats nativos ou agrícolas. A maioria das plantas geralmente absorve cloro em níveis muito maiores do que os necessários ao funcionamento normal.

MANGANÊS. Os íons manganês (Mn^{2+}) ativam várias enzimas nas células vegetais. As descarboxilases e desidrogenases envolvidas no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) em particular são especificamente ativadas pelo manganês. A função mais bem-definida do manganês é a da reação fotossintética pela qual o oxigênio é produzido a partir da água (Marschner 1995). O sintoma principal da deficiência de manganês é a clorose internervura, associada com o desenvolvimento de pequenas manchas necróticas. Essa clorose pode ocorrer em folhas jovens ou mais velhas, dependendo da espécie vegetal e da taxa de crescimento.

SÓDIO. A maioria das espécies que utiliza as rotas C_4 e CAM de fixação do carbono (ver Capítulo 8) requer íons sódio (Na^+). Nestas plantas, o sódio parece ser vital para a regeneração do fosfoenolpiruvato, substrato da primeira carboxilação nas rotas C_4 e CAM (Johnstone e cols., 1988). Sob deficiência de sódio, essas plantas exibem clorose e necrose ou deixam de florescer. Muitas espécies C_3 igualmente se beneficiam de uma exposição a baixos níveis de íons sódio. O sódio estimula o crescimento por meio de uma maior expansão celular, além de poder parcialmente substituir o potássio como um soluto osmoticamente ativo.

Grupo 4: Deficiências de nutrientes minerais que estão envolvidos em reações redox. Este grupo de cinco micronutrientes inclui os metais ferro, zinco, cobre, níquel e molibdênio, os quais podem sofrer oxidações e reduções reversíveis (exemplo, $Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$), além de desempenharem importantes funções na transferência de elétrons e na transformação de energia. Usualmente são encontrados em associação com moléculas maiores, como citocromos, clorofila e proteínas (normalmente enzimas).

FERRO. O ferro tem um importante papel como componente de enzimas envolvidas na transferência de elétrons (reações redox), como citocromos. Nesse papel, ele é reversivelmente oxidado de F^{2+} a Fe^{3+} durante a transferência de elétrons. Da mesma forma que na deficiência de magnésio, um sintoma característico da deficiência de ferro é a clorose internervura. Ao contrário dos sintomas de deficiência de magnésio, tais sintomas aparecem inicialmente nas folhas mais jovens porque o ferro não pode ser prontamente mobilizado das folhas mais velhas. Sob condições de deficiência extrema ou prolongada, as nervuras podem tornar-se cloróticas também, fazendo com que toda a folha se torne branca.

As folhas tornam-se cloróticas porque o ferro é necessário para a síntese de alguns dos complexos clorofila-proteína no cloroplasto. A baixa mobilidade do ferro deve-se, provavelmente, à sua precipitação nas folhas mais velhas na forma de óxidos ou fosfatos insolúveis ou à formação de complexos com a fitoferritina, uma proteína de ligação de ferro encontrada na folha e em outras partes da planta (Oh e cols., 1996). A precipitação do ferro diminui a subseqüente mobilização do metal para dentro do floema, para o transporte de longa distância.

ZINCO. Muitas enzimas requerem íons zinco (Zn^{2+}) para suas atividades, e este elemento pode ser exigido para a síntese de clorofila em algumas plantas. A deficiência de zinco é caracterizada pela redução do crescimento internodal, e, como resultado, a planta apresenta um hábito de crescimento rosetado, no qual as folhas formam um agrupamento circular que se irradia no solo ou perto dele. As folhas podem ser também pequenas e retorcidas, com margens de aparência enrugada. Tais sintomas podem resultar da perda da

capacidade de produzir quantidades suficientes da auxina ácido indolacético. Em algumas espécies (milho, sorgo, feijoeiro), as folhas mais velhas podem tornar-se cloróticas entre as nervuras e, então, desenvolver manchas necróticas brancas. É possível que a clorose seja uma expressão da necessidade de zinco para a síntese de clorofila.

COBRE. Como o ferro, o cobre está associado com enzimas envolvidas em reações redox, sendo reversivelmente oxidado de Cu^{+} a Cu^{2+}. Um exemplo de tal enzima é a plastocianina, a qual está envolvida no transporte de elétrons durante as reações dependentes de luz da fotossíntese (Haehnel, 1984). O sintoma inicial da deficiência de cobre é a produção de folhas verde escuras, que podem conter manchas necróticas. As manchas necróticas aparecem primeiro nos ápices das folhas jovens e então se estendem em direção à base da folha, ao longo das margens. As folhas podem também ficar retorcidas ou malformadas. Sob deficiência extrema de cobre, há possibilidade de as folhas caírem prematuramente.

NÍQUEL. A urease é a única enzima que se conhece em plantas superiores que contém níquel, embora microrganismos fixadores de nitrogênio exijam níquel para a enzima que reprocessa parte do gás hidrogênio gerado durante a fixação (hidrogenase de captação de hidrogênio) (ver Capítulo 12). Plantas deficientes em níquel acumulam uréia em suas folhas e, em conseqüência, apresentam necrose nos ápices foliares. Plantas cultivadas em solo raramente, ou mesmo nunca, mostram sinais de deficiência de níquel, pois as quantidades requeridas de níquel são minúsculas.

MOLIBDÊNIO. Os íons molibdênio (Mo^{+4} até Mo^{+6}) são componentes de várias enzimas, incluindo nitrato redutase e nitrogenase. A nitrato redutase catalisa a redução do nitrato a nitrito durante sua assimilação pela célula vegetal; a nitrogenase converte o gás nitrogênio a amônia em microrganismos fixadores de nitrogênio (ver Capítulo 12). O primeiro indicativo da deficiência de molibdênio é a clorose generalizada entre as nervuras e a necrose das folhas mais velhas. Em algumas plantas, como couve-flor e brócolis, por exemplo, as folhas podem não se tornar necróticas, mas, por outro lado, podem parecer retorcidas e, subseqüentemente, morrer. Há possibilidade de a formação de flores ser impedida ou de as flores caírem prematuramente.

Como o molibdênio está envolvido tanto com a redução do nitrato quanto com a fixação de nitrogênio, a deficiência de molibdênio pode acarretar uma deficiência de nitrogênio, caso a planta dependa da fixação simbiótica de nitrogênio. Embora as plantas necessitem apenas de pequenas quantidades de molibdênio, alguns solos suprem níveis inadequados. Pequenas adições de molibdênio nesses solos podem melhorar bastante o crescimento de culturas e forrageiras a um custo desprezível.

A análise de tecidos vegetais revela deficiências minerais

As necessidades de elementos minerais mudam ao longo do crescimento e do desenvolvimento de uma planta. Em plantas cultivadas, os níveis de nutrientes em determinados estádios de crescimento influenciam a produtividade de tecidos economicamente importantes (tubérculos, grãos e outros). Para otimizar as produções, os produtores usam análises dos níveis de nutrientes no solo e no tecido vegetal a fim de determinar o calendário de fertilizações.

A **análise de solo** é a determinação química do conteúdo de nutrientes em uma amostra de solo da zona radicular. Conforme será discutido mais tarde neste capítulo, tanto a química quanto a biologia dos solos são complexas, e os resultados das análises variam com os métodos de amostragem, condições de armazenagem das amostras e técnicas de extração de nutrientes. Talvez o mais importante seja que uma determinada análise de solo reflete os níveis de nutrientes *potencialmente* nele disponíveis para as raízes das plantas, mas a análise de solo não informa a quantidade de um determinado mineral de que a planta realmente precisa ou é capaz de absorver. Esta informação adicional é melhor determinada por análise de tecido vegetal.

O uso adequado da **análise de tecido vegetal** requer um entendimento das relações entre o crescimento vegetal (ou produtividade) e a concentração de minerais nas amostras de tecido vegetal (Bouma, 1983). Conforme mostram os dados plotados na Figura 5.3, quando a concentração de nutrientes em uma amostra de tecido é baixa, o crescimento é reduzido. Nessa **zona de deficiência** da curva, uma aumento na disponibilidade de nutrientes é diretamente relacionada a um aumento no crescimento ou produtividade. À medida que a disponibilidade de nutrientes continua a aumentar, é atingido um ponto no qual uma adição continuada de nutrientes não mais se relaciona a aumentos no crescimento ou produtividade, mas resulta em aumentos na concentração nos tecidos. Esta região da curva é, via de regra, chamada de **zona adequada**.

A transição ente as zonas de deficiência e adequada da curva revela a concentração crítica do nutriente (ver Figura 5.3), a qual pode ser definida como o conteúdo mínimo de nutriente no tecido que se correlaciona com crescimento ou produtividade máximos. À medida que a concentração do nutriente no tecido aumenta além

FIGURA 5.3 Relação entre produtividade (ou crescimento) e conteúdo de nutriente do tecido vegetal. O parâmetro de produtividade pode ser expresso em termos de massa seca de parte aérea ou altura. Três zonas — de deficiência, adequada e de toxidez — são indicadas no gráfico. Para gerar dados desse tipo, as plantas são cultivadas sob condições nas quais a concentração de um nutriente essencial é alterada, enquanto os demais são adequadamente supridos. O efeito da variação na concentração desse nutriente durante o crescimento da planta reflete-se no crescimento ou na produtividade. A concentração crítica desse nutriente é a concentração abaixo da qual a produtividade ou crescimento são reduzidos.

da zona adequada, o crescimento ou produtividade diminuem em ocorrência da toxicidade (esta é a **zona de toxidez**).

Para avaliar a relação entre o crescimento e a concentração de nutriente no tecido, pesquisadores cultivam plantas em solo ou solução nutritiva, nos quais todos os nutrientes estão presentes em concentrações adequadas, exceto pelo nutriente sob avaliação. No começo do experimento, o nutriente limitante é adicionado em concentrações crescentes para diferentes grupos de plantas e as concentrações do nutriente em tecidos específicos são correlacionadas com uma medida específica de crescimento ou produtividade. Diversas curvas são estabelecidas para cada elemento, uma para cada tecido e idade de tecido.

Pelo fato de os solos agrícolas serem normalmente limitados nos elementos nitrogênio, fósforo e potássio, muitos produtores utilizam, pelo menos, curvas para os mesmos. Se há suspeita de uma deficiência de nutriente, medidas são tomadas para corrigir a deficiência, antes que ela reduza o crescimento ou a produtividade. A análise do vegetal tem-se mostrado útil no estabelecimento do calendário de fertilização que sustente a produtividade e assegure a qualidade de alimento de muitas culturas.

TRATANDO DEFICIÊNCIAS NUTRICIONAIS

Muitas práticas agrícolas tradicionais e de subsistência promovem a reciclagem de elementos minerais. As plantas cultivadas absorvem os nutrientes do solo; humanos e animais consomem as plantas cultivadas localmente e os resíduos da cultura e as fezes humanas e animais devolvem os nutrientes ao solo. As principais perdas de nutrientes desses sistemas agrícolas resultam da lixiviação, que carrega os nutrientes dissolvidos na água de drenagem. Em solos ácidos, a lixiviação pode ser reduzida pela adição de calcário — uma mistura de CaO, $CaCO_3$ e $Ca(OH)_2$ — a fim de tornar o solo mais alcalino, pois muitos elementos minerais formam compostos menos solúveis quando o pH é maior do que 6 (Figura 5.4).

Nos sistemas agrícolas de alta produtividade dos países industrializados, a remoção unidirecional de nutrientes do solo para a cultura pode ser significativa, visto que uma grande fração da biomassa da cultura deixa a área de cultivo. As plantas sintetizam todos os seus componentes a partir de substâncias inorgânicas básicas e luz solar; assim, é importante devolver esses nutrientes perdidos ao solo por meio da adição de fertilizantes.

A produtividade das culturas pode ser melhorada pela adição de fertilizantes

A maioria dos fertilizantes químicos contém sais inorgânicos dos macronutrientes nitrogênio, fósforo e potássio (ver Tabela 5.1). Os fertilizantes que contêm apenas um desses três nutrientes são chamados de **fertilizantes simples**, cujos exemplos são superfosfato, nitrato de amônio e muriato de potassa (uma fonte de potássio). Fertilizantes que contêm dois ou mais nutrientes minerais são chamados de **fertilizantes compostos** ou **fertilizantes mistos**, e os números no rótulo da embalagem, como 10-14-10 referem-se às porcentagens efetivas de N, P_2O_5 e K_2O, respectivamente, no fertilizante.

Com produção agrícola de longo prazo, o consumo de micronutrientes pode atingir um ponto no qual eles, também, precisam ser adicionados ao solo como fertilizantes. Adicionar micronutrientes ao solo também pode ser necessário para corrigir uma deficiência preexistente. Por exemplo, alguns solos nos Estados Unidos são deficientes em boro, cobre, zinco, manganês, molibdênio ou ferro (Mengel e Kirkby, 1987) e podem se beneficiar da suplementação com nutrientes.

Produtos químicos também podem ser aplicados no solo para modificar seu pH. Conforme mostra a Figura 5.4, o pH do solo afeta a disponibilidade de todos os nutrientes minerais. A adição de calcário, como mencionado anteriormente, pode aumentar o pH de solos ácidos; a adição de enxofre elementar pode abaixar o pH de solos alcalinos. Neste último caso, microrganismos absorvem o enxofre e, subseqüentemente, liberam íons hidrogênio que acidificam o solo.

Os **fertilizantes orgânicos**, em contraste com os fertilizantes químicos, originam-se de resíduos de plantas ou animais ou de depósitos naturais em rochas. Os resíduos vegetais e animais contêm muitos dos nutrientes sob forma de compostos orgânicos. Para que as plantas possam absorver esses nutrientes dos resíduos, os

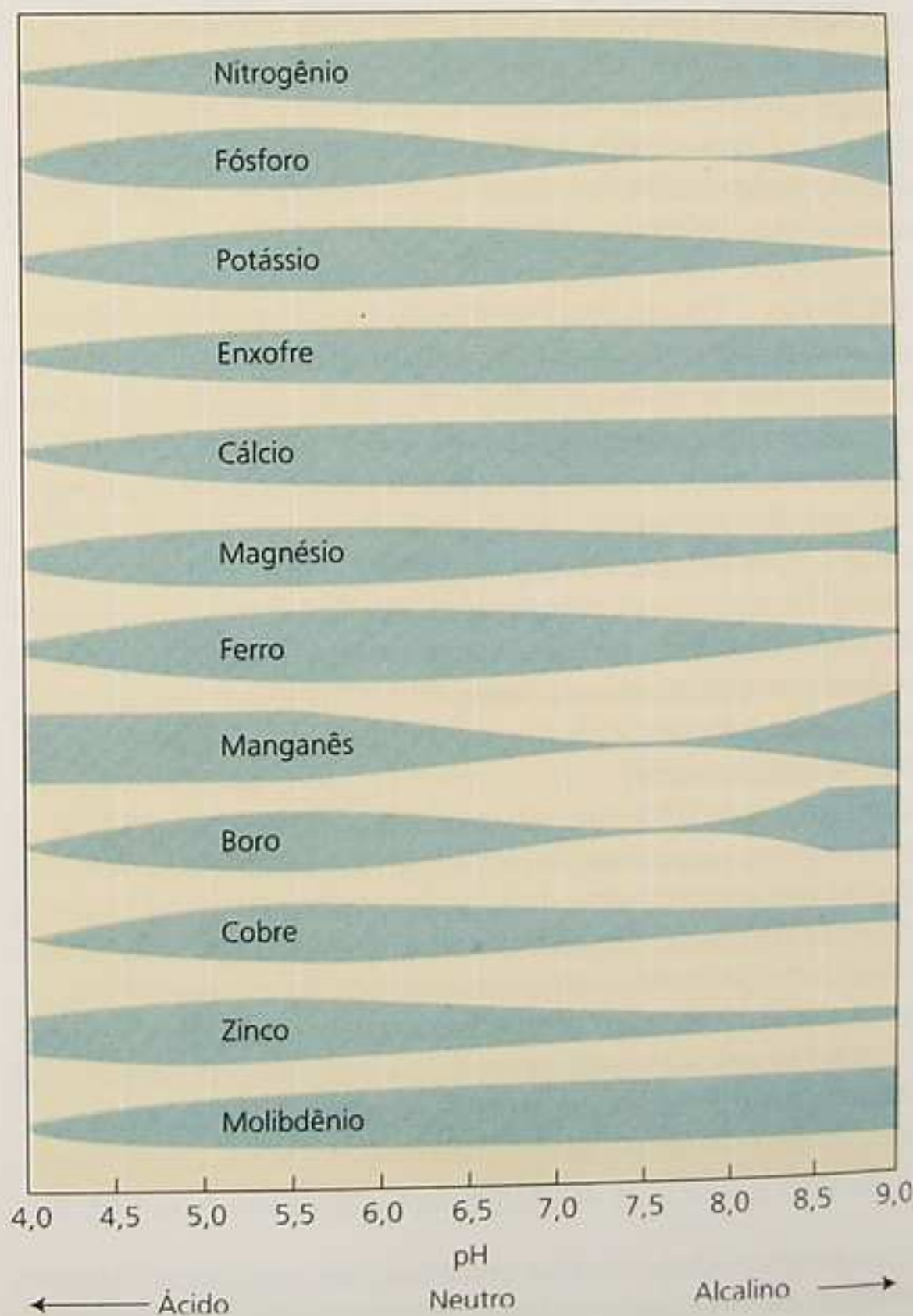



FIGURA 5.4 Influência do pH do solo na disponibilidade de nutrientes em solos orgânicos. A espessura das áreas sombreadas indica o grau de disponibilidade do nutriente para a raiz do vegetal. Todos esses nutrientes estão disponíveis na faixa de pH de 5,5 a 6,5 (Lucas e Davis, 1961).

compostos orgânicos precisam ser degradados, normalmente pela ação de microrganismos do solo, segundo um processo denominado **mineralização.** A mineralização depende de muitos fatores, incluindo temperatura, disponibilidade de água e oxigênio, além de tipo e número de microrganismos presentes no solo.

Como conseqüência, a taxa de mineralização é altamente variável e os nutrientes de resíduos orgânicos tornam-se disponíveis às plantas por períodos que variam de dias a meses ou anos. A baixa taxa de mineralização impede o uso eficiente de fertilizantes, de forma que as plantações dependentes somente de fertilizantes orgânicos podem necessitar da adição de muito mais nitrogênio ou fósforo, além de sofrerem perdas ainda maiores de nutrientes do que plantações que usam fertilizantes químicos. Os resíduos de fertilizantes orgânicos melhoram a estrutura física da maioria dos solos, aumentando a retenção de água durante a seca e aumentando a drenagem em períodos chuvosos.

Alguns nutrientes minerais podem ser absorvidos pelas folhas

Além de os nutrientes serem adicionados ao solo como fertilizantes, alguns nutrientes minerais podem ser aplicados às folhas por aspersão, em um processo conhecido como **adubação foliar,** podendo as folhas absorverem os nutrientes aplicados. Em alguns casos, este método pode ter vantagens agronômicas, comparado à aplicação de nutrientes no solo. A adubação foliar pode reduzir o tempo de retardo entre a aplicação e a absorção pela planta, o que poderia ser importante durante uma fase de rápido crescimento. Ele também pode contornar o problema de restrição de absorção de um nutriente do solo. Por exemplo, a aplicação foliar de nutrientes minerais como ferro, manganês e cobre pode ser mais eficiente do que a aplicação via solo, onde eles são adsorvidos às partículas do solo e, assim, tornam-se menos disponíveis ao sistema radicular.

A absorção de nutrientes pelas folhas de plantas é mais efetiva quando a solução de nutrientes permanece sobre a folha na forma de uma fina película (Mengel e Kirkby, 1987). A produção de uma lâmina fina exige que as soluções de nutrientes sejam suplementadas com produtos químicos surfactantes, como o detergente *Tween 80*, que reduz a tensão superficial. O movimento de nutrientes para dentro da planta parece envolver a difusão por meio da cutícula e a absorção pelas células foliares. Embora a absorção através do poro estomático possa proporcionar um trajeto para dentro da folha, a arquitetura do poro (ver Figuras 4.13 e 4.14) impede grandemente a penetração líquida (Ziegler, 1987).

Para que a aplicação foliar de nutrientes seja bem-sucedida, os danos às folhas devem ser minimizados. Se a aspersão foliar for aplicada em um dia quente, quando a evaporação é alta, os sais podem se acumular na superfície foliar e provocar queimadura ou chamuscamento. A aplicação em dias frescos ou à tardinha ajuda a aliviar esse problema. A adição de calcário à aspersão diminui a solubilidade de muitos nutrientes e limita a toxicidade. A aplicação foliar tem-se mostrado economicamente exitosa, sobretudo em culturas arbóreas e trepadeiras, como a videira, mas ela também é usada com cereais. Os nutrientes aplicados às folhas poderiam salvar um pomar ou uma videira quando os nutrientes aplicados ao solo fossem de correção muito lenta. Em trigo, o nitrogênio aplicado às folhas durante os estádios tardios de crescimento melhora o conteúdo protéico das sementes.

SOLO, RAÍZES E MICRÓBIOS

O solo é um substrato físico, químico e biológico complexo. Ele é um material heterogêneo, contendo fases sólida, líquida e gasosa (ver Capítulo 4). Todas essas fases interagem com os nutrientes minerais. As partículas inorgânicas da fase sólida fornecem um reservatório de potássio, cálcio, magnésio e ferro. Também associados a essa fase sólida, estão os compostos orgânicos constituídos de nitrogênio, fósforo e enxofre, dentre outros elementos. A fase líquida do solo constitui a solução do solo, que contém íons minerais dissolvidos e serve com meio para o movimento de íons até a superfície da raiz. Gases como oxigênio, dióxido de carbono e nitrogênio estão dissolvidos na solução do solo, mas nas raízes os gases são trocados predominantemente pelos espaços de ar entre as partículas de solo.

Do ponto de vista biológico, o solo consiste em um ecossistema diversificado onde as raízes das plantas e os microrganismos do solo competem fortemente pelos nutrientes minerais. Apesar disso, as raízes e os microrganismos podem formar alianças para benefício mútuo (simbioses). Nesta seção discutiremos a importância das propriedades do solo, da estrutura radicular e da relações simbióticas micorrízicas para a nutrição mineral das plantas. O Capítulo 12 aborda as relações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Partículas de solo negativamente carregadas afetam a adsorção dos nutrientes minerais

As partículas de solo, tanto inorgânicas quanto orgânicas, têm cargas predominantemente negativas em suas superfícies. Muitas partículas inorgânicas de solo formam redes cristalinas, que são arranjos tetraédricos das formas catiônicas de alumínio e silício (Al^{3+} e Si^{4+}) ligadas a átomos de oxigênio, assim formando aluminatos e silicatos. Quando cátions de menor carga substituem o Al^{3+} e Si^{4+}, as partículas inorgânicas de solo ficam negativamente carregadas.

As partículas orgânicas do solo originam-se dos produtos da decomposição microbiana de plantas, animais e microrganismos mortos. As cargas negativas de superfície das partículas orgânicas resultam da dissociação dos íons hidrogênio dos ácidos carboxílicos e grupos fenólicos presentes neste componente dos solos. A maiorias das partículas de solo do mundo, no entanto, é inorgânica.

Os solos inorgânicos são categorizados de acordo com o tamanho de partículas:

- A brita tem partículas maiores do que 2 mm.
- A areia grossa tem partículas entre 0,2 e 2 mm.
- A areia fina tem partículas entre 0,02 e 0,2 mm.
- O silte tem partículas entre 0,002 e 0,02 mm.
- A argila tem partículas menores do que 0,002 mm (ver Tabela 4.1).

Os materiais argilosos que contêm silicatos são ainda divididos em três grandes grupos — caulinita, ilita e montmorilonita — com base em diferenças em suas propriedades estruturais e físicas (Tabela 5.5). O grupo caulinita é geralmente encontrado em solos muito intemperizados; os grupos montmorilonita e ilita são encontrados em solos menos intemperizados.

TABELA 5.5
Comparação das propriedades dos três principais tipos de argilas encontradas no solo

Propriedade	Tipo de argila		
	Montmorilonita	Ilita	Caulinita
Tamanho (µm)	0,01-1,0	0,1-2,0	0,1-5,0
Forma	Flocos irregulares	Flocos irregulares	Cristais hexagonais
Coesão	Alta	Média	Baixa
Capacidade de embebição	Alta	Média	Baixa
Capacidade de troca de cátions (miliequivalentes 100 g-1)	80-100	15-40	3-15

Fonte: Segundo Brady, 1974.

Os cátions minerais como amônio (NH_4^+) e potássio (K^+) adsorvem-se às cargas negativas de superfície das partículas inorgânicas e orgânicas de solo. Essa adsorção de cátions é um fator importante para a fertilidade do solo. Os cátions minerais adsorvidos à superfície das partículas de solo não são facilmente perdidos quando o solo é lavado pela água e proporcionam uma reserva de nutrientes disponível às raízes das plantas. Os nutrientes minerais adsorvidos desta forma podem ser substituídos por outros cátions em um processo conhecido com **troca catiônica** (Figura 5.5). O grau com que um solo pode adsorver ou trocar íons* é denominado *capacidade de troca catiônica (CTC)* e é altamente dependente do tipo de solo. Um solo com grande capacidade de troca de cátions geralmente tem uma maior reserva de nutrientes.

Os ânions minerais como nitrato (NO_3^-) e cloreto (Cl^-) tendem a ser repelidos pela carga negativa na superfície das partículas do solo e permanecem dissolvidos na solução do solo. Assim, a capacidade de troca aniônica da maioria dos solos agrícolas é pequena, quando comparada à capacidade de troca de cátions. Dentre os ânions, o nitrato permanece móvel na solução do solo, onde é suscetível à lixiviação pela água que se movimenta através do solo.

Os íons fosfato ($H_2PO_2^-$) podem ligar-se às partículas de solo contendo alumínio ou ferro, pois os íons positivamente carregados de ferro e alumínio (Fe^{2+}, Fe^{3+} e Al^{3+}) têm grupos hidroxila (OH^-), que são trocados por fosfato. Como resultado, o fosfato pode ser fortemente ligado e sua mobilidade e disponibilidade no solo podem limitar o crescimento vegetal.

Sulfato (SO_4^{2-}) na presença de Ca^{2+} forma gesso ($CaSO_4$). O gesso é apenas levemente solúvel, mas libera sulfato suficiente para sustentar o crescimento vegetal. A maioria dos solos não-ácidos contém quantidades substanciais de cálcio; em conseqüência, a mobilidade do sulfato nesses solos é baixa, de forma que o sulfato não é altamente suscetível à lixiviação.

*N de T. Na verdade, quando nos referimos à capacidade do solo de trocar íons, tal como foi descrito no texto, caracterizamos a *capacidade de troca iônica* do solo (cátions + ânions). Entretanto, como ocorre uma adsorção muito maior de cátions do que de ânions à superfície das partículas do solo, devido ao predomínio de cargas negativas nestas superfícies, o componente principal dessa capacidade de troca iônica é a capacidade de troca catiônica.

O pH do solo afeta a disponibilidade de nutrientes, os micróbios do solo e o crescimento radicular

A concentração de íons hidrogênio (pH) é uma propriedade importante dos solos porque afeta o crescimento de raízes e os microrganismos do solo. O crescimento radicular é normalmente favorecido em solos levemente ácidos, a valores de pH entre 5,5 e 6,5. Os fungos normalmente predominam em solos ácidos; as bactérias tornam-se mais abundantes em solos alcalinos. O pH do solo determina a disponibilidade dos nutrientes do solo (ver Figura 5.4). A acidez promove a intemperização de rochas, que libera K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+} e aumenta a solubilidade de carbonatos, sulfatos e fosfatos. O aumento na solubilidade dos nutrientes facilita a disponibilidade dos mesmos para as raízes.

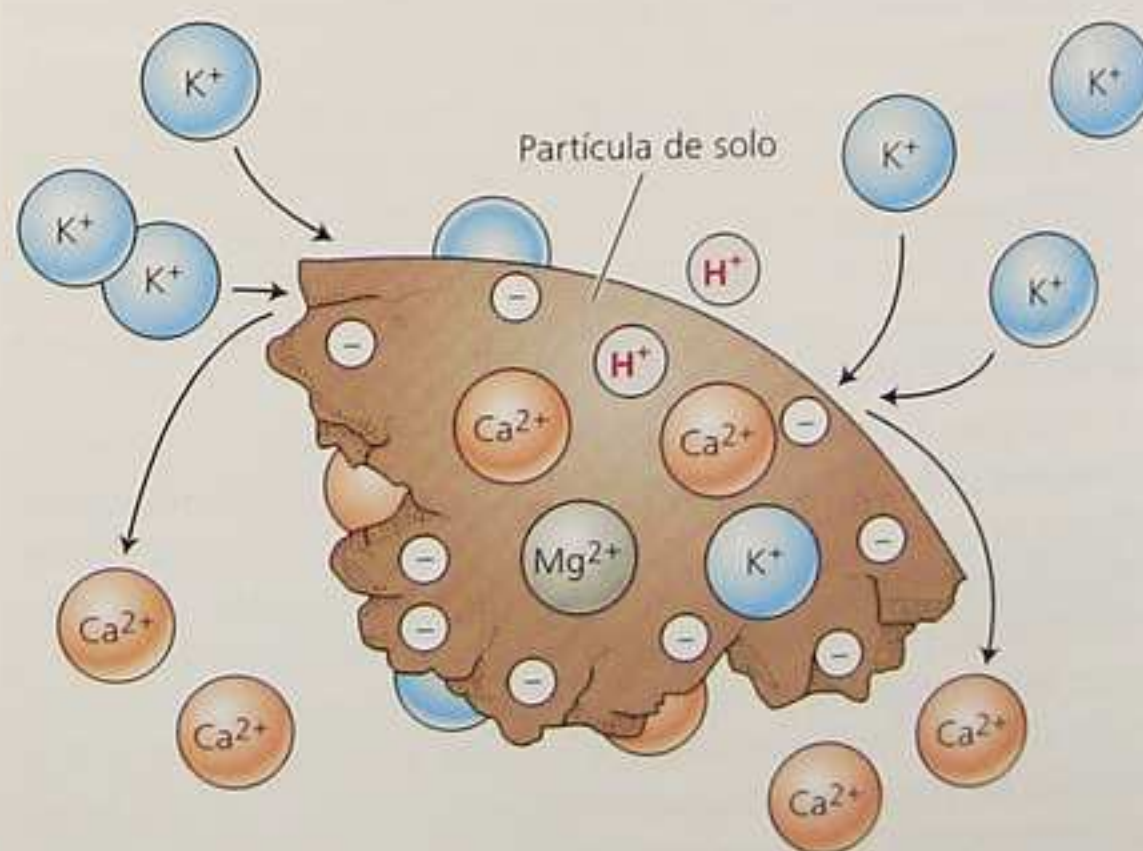



FIGURA 5.5 O princípio da troca de catiônica na superfície de uma partícula de solo. Os cátions são ligados à superfície das partículas do solo porque a superfície é carregada negativamente. A adição de um cátion como o potássio (K^+) pode deslocar outro cátion como o cálcio (Ca^{2+}) de sua ligação na superfície da partícula de solo e torná-lo disponível para a absorção pelas raízes.

Os principais fatores que reduzem o pH do solo são a decomposição da matéria orgânica e a quantidade de chuva. O dióxido de carbono é produzido como resultado da decomposição de material orgânico e equilibra-se com a água do solo segundo a seguinte reação:

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

Esta reação libera íons hidrogênio (H^+), reduzindo o pH do solo. A decomposição microbiana do material orgânico também produz amônia e sulfeto de hidrogênio, que pode ser oxidado no solo, formando os ácidos fortes ácido nítrico (HNO3) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), respectivamente. Os íons hidrogênio podem deslocar K+, Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+} do complexo de troca de cátions do solo. A lixiviação pode, então, remover esses íons das camadas superiores do solo, deixando o solo mais ácido. Por outro lado, a intemperização de rochas em regiões mais áridas libera K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} e Mn^{2+} para o solo, mas, devido à baixa pluviosidade esses íons não são lixiviados das camadas superiores do solo e este se mantém alcalino.

Minerais em excesso no solo limitam o crescimento das plantas

Quando minerais em excesso estão presentes no solo, diz-se que o mesmo é salino, podendo o crescimento vegetal ser restringido caso tais íons minerais atinjam níveis que limitem a disponibilidade hídrica ou que excedam a zona adequada de um determinado nutriente (ver Capítulo 25). Cloreto de sódio e sulfato de sódio são os sais mais comuns em solos salinos. O excesso de minerais no solo pode ser um fator de grande importância em regiões áridas e semiáridas, pois a precipitação é insuficiente para lixiviar os íons minerais das camadas de solo junto à superfície. A agricultura com irrigação promove a salinização dos solos se água insuficiente é aplicada para lavar o sal para camadas abaixo da zona de enraizamento. A água de irrigação pode conter de 100 a 1.000 g de minerais por metro cúbico. Uma cultura normal requer cerca de 4.000 m^3 de água por acre. Conseqüentemente, 400 a 4.000 kg de minerais podem ser adicionados ao solo por cultivo (Marschner, 1995).

Em solos salinos, as plantas enfrentam o **estresse salino**. Enquanto muitas plantas são afetadas de forma adversa pela presença de níveis relativamente baixos de sal, outras podem sobreviver com altos níveis (**plantas tolerantes ao sal**) ou mesmo prosperar (**halófitas**) sob tais condições. Os mecanismos pelos quais as plantas toleram a salinidade são complexos (ver Capítulo 25), envolvendo síntese molecular, indução enzimática e transporte de membrana. Em algumas espécies, os minerais em excesso não são absorvidos; em outras, o são, mas são excretados da planta por glândulas de sal associadas às folhas. Para impedir o acúmulo tóxico de íons minerais no citosol, muitas plantas o seqüestram para o vacúolo (Stewart e Ahmad, 1983). Há esforços em andamento para conferir tolerância salina a espécies cultivadas sensíveis ao sal, utilizando tanto o melhoramento clássico quanto a biologia molecular (Hasegawa e cols., 2000).

Um outro problema importante relacionado ao excesso de minerais é o acúmulo de metais pesados no solo, que pode causar toxicidade severa em plantas, assim como em humanos (ver **Tópico 5.1 na Internet**). Os metais pesados incluem zinco, cobre, cobalto, níquel, mercúrio, chumbo, cádmio, prata e cromo (Berry e Walace, 1981).

As plantas desenvolvem extensos sistemas radiculares

A habilidade das plantas em obter água e nutrientes minerais do solo está relacionada à sua capacidade de desenvolver um extenso sistema radicular. No final da década de 1930, H. J. Dittmer examinou o sistema radicular de uma única planta de centeio depois de 16 semanas de crescimento e estimou que a mesma tinha 13×10^6 eixos radiculares primários e secundários, estendendo-se mais do que 500 km em comprimento e proporcionando 200 m^2 de área de superfície (Dittmer, 1937). Essa planta também tinha mais do que 1.010 pêlos radiculares, proporcionando 300 m^2 adicionais de área de superfície.

No deserto, as raízes de plantas do gênero *Prosopis* podem estender-se por mais do que 50 m para alcançar a água subterrânea. Plantas cultivadas anualmente têm raízes que normalmente crescem entre 0,1 e 2,0 m em profundidade e se estendem lateralmente a distâncias de 0,3 a 1,0 m. Em pomares, os sistemas radiculares principais de árvores plantadas com espaçamento de 1 m entre si atingem um comprimento total de 12 a 18 km por árvore. A produção anual de raízes em ecossistemas naturais pode facilmente ultrapassar a de partes aéreas, de forma que, em muitos casos, as porções aéreas de uma planta representam apenas o "topo de um *iceberg*".

As raízes das plantas podem crescer continuamente ao logo de todo o ano. A proliferação das mesmas, no entanto, depende da disponibilidade de água e nutrientes no microambiente que circunda a raiz, a chamada **rizosfera**. Se a rizosfera é pobre em nutrientes ou muito seca, o crescimento radicular é lento. À medida que as condições na rizosfera melhoram, o crescimento radicular aumenta. Se a fertilização e a irrigação fornecem nutrientes e água em abundância, o crescimento radicular pode não acompanhar o da parte aérea. O crescimento das plantas nestas condições torna-se limitado pelo carbono, e um sistema radicular relativamente pequeno atende as necessidades nutricionais da planta inteira (Bloom e cols., 1993). Raízes que crescem abaixo da superfície do solo são estudadas por meio de técnicas especiais (ver **Tópico 5.2 na Internet**).

Os sistemas radiculares diferem na forma, mas se baseiam em estruturas comuns

A *forma* do sistema radicular difere muito entre as espécies vegetais. Em monocotiledôneas, o desenvolvimento radicular começa com a emergência de três a seis eixos radiculares **primários** (ou seminais) da semente em germinação. À medida que a planta cresce, ela estende novas raízes adventícias, chamadas de **raízes nodais** ou raízes escora. Com o passar do tempo, os eixos radiculares primários e nodais crescem e se ramificam extensamente, formando um complexo sistema radicular fasciculado (Figura 5.6). Nos sistemas radiculares fasciculados, todas as raízes geralmente têm o mesmo diâmetro (exceto quando as condições ambientais ou interações com patógenos modificam a sua estrutura), de forma que se torna difícil distinguir um eixo radicular principal.

Diferentemente das monocotiledôneas, as dicotiledôneas desenvolvem sistemas radiculares com um eixo radicular principal único, chamado de raiz pivotante, que pode engrossar como resultado da atividade cambial secundária. Desse eixo radicular principal, desenvolvem-se raízes laterais, formando um sistema radicular extensamente ramificado (Figura 5.7).

O desenvolvimento do sistema radicular tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas depende da atividade do me-

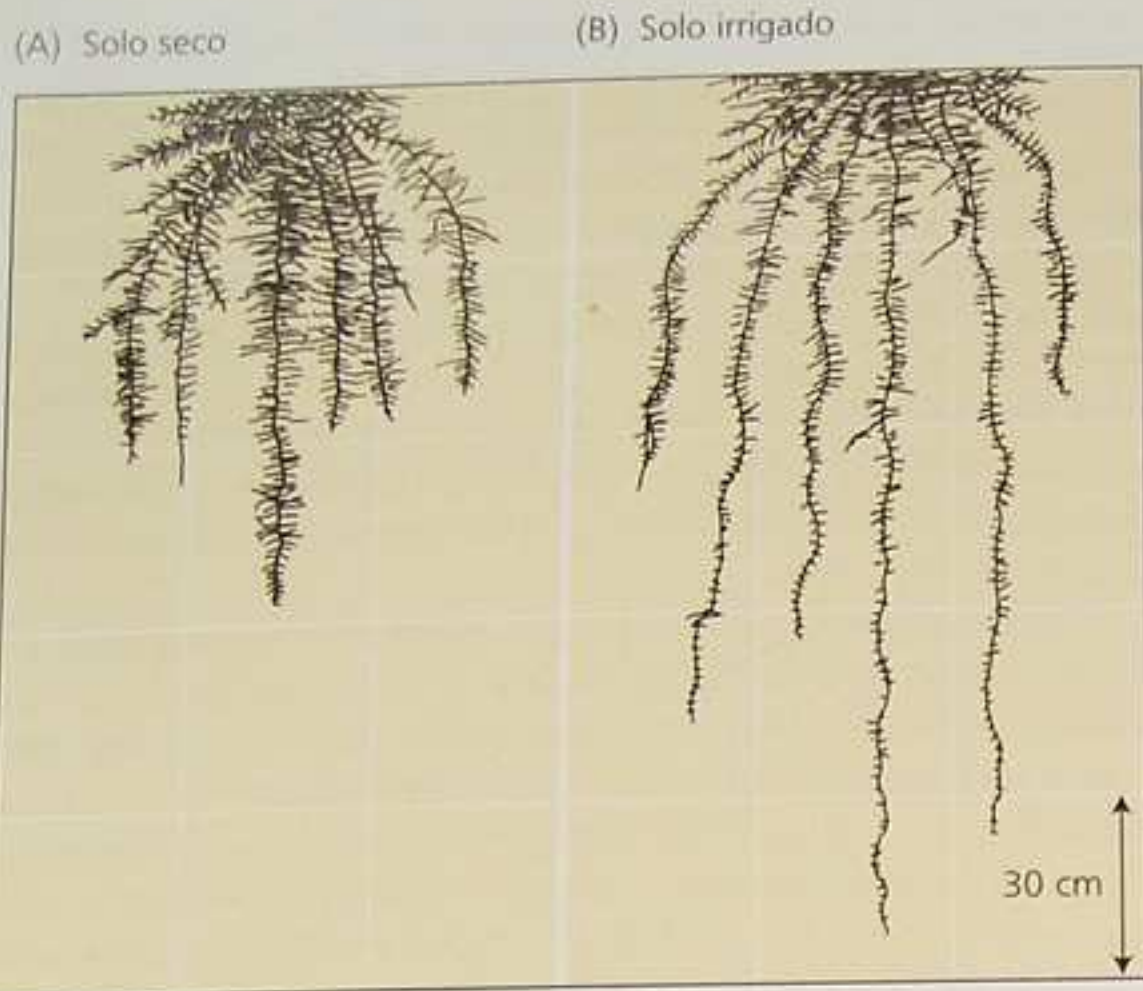



FIGURA 5.6 Sistemas radiculares fasciculados de trigo (uma monocotiledônea). (A) Sistema radicular de uma planta madura (3 meses de idade) de trigo crescendo em solo seco. (B) Sistema radicular de uma planta de trigo crescendo em solo irrigado. É visível que a morfologia do sistema radicular é afetada pela quantidade de água presente no solo. Em um sistema radicular fasciculado, os eixos radiculares primários não podem ser mais distinguidos (Weaver, 1926).

FIGURA 5.7 Sistema radicular pivotante de duas dicotiledôneas adequadamente irrigadas: beterraba e alfafa. O sistema radicular da beterraba é típico de cinco meses de crescimento; o sistema radicular da alfafa é típico de dois anos de crescimento. Em ambas as dicotiledôneas o sistema radicular mostra um eixo radicular vertical principal. No caso da beterraba, a porção superior do sistema radicular pivotante é engrossada devido à sua função como tecido de armazenagem (Weaver, 1926).

ristema da raiz e da produção de meristemas de raízes laterais. A Figura 5.8 mostra um diagrama geral da região apical da raiz de uma planta e identifica as três zonas de atividade: meristemática, alongamento e maturação.

Na **zona meristemática,** as células dividem-se tanto em direção à base radicular, para formar células que se diferenciarão em tecidos da raiz funcional, quanto em direção ao ápice radicular, para formar a **coifa.** A coifa protege as delicadas células meristemáticas à medida que a raiz movimenta-se através do solo. Ela também secreta um material gelatinoso chamado *mucigel*, que freqüentemente envolve o ápice radicular. A função precisa do *mucigel* não é bem conhecida, mas tem sido sugerido que ele lubrifica a penetração da raiz através do solo, protege o ápice radicular da dessecação, promove a transferência de nutrientes à raiz ou afeta a interação entre raízes e microrganismos do solo (Russel, 1977). A coifa é essencial para a percepção da gravidade, sinal que direciona o crescimento das raízes para baixo. Tal processo é chamado de **resposta gravitrópica** (ver Capítulo 19).

A divisão celular no ápice radicular propriamente dito é relativamente lenta; assim, esta região é denominada **centro quiescente.** Após algumas gerações de lentas divisões celulares, células radiculares deslocadas cerca de 0,1 mm do ápice começam a se dividir mais rapidamente. A divisão celular novamente vai diminuindo cerca de 0,4 mm do ápice, e as células expandem-se igualmente em todas as direções.

A **zona de alongamento** começa a 0,7 a 1,5 mm do ápice (ver Figura 5.8). Nessa zona, as células alongam-se rapidamente e apresentam uma rodada final de divisões para produzir um anel central de células denominado **endoderme.** As paredes desta camada de células endodérmicas tornam-se espessadas, e a suberina (ver Capítulo 13) depositada nas paredes radiais forma a **estria de Caspary,** uma estrutura hidrofóbica que impede o movimento apoplástico de água ou solutos através da raiz (ver Figura 4.3). A endoderme divide a raiz em duas regiões: o **córtex,** para fora, e o **estelo,** para dentro. O estelo contém os elementos vasculares da raiz: o **floema,** que transporta metabólitos da parte aérea para a raiz, e o xilema, que transporta água e solutos para a parte aérea.

O floema desenvolve-se mais rapidamente do que o xilema, evidenciando o fato de que a função do floema é crítica junto ao ápice radicular. Grandes quantidades de carboidratos devem fluir através do floema em direção às zonas apicais em crescimento, para

sustentar a divisão e o alongamento celular. Os carboidratos proporcionam às células em rápido crescimento uma fonte de energia e esqueletos de carbono necessários para a síntese de compostos de carbono. Açúcares de seis carbonos (hexoses) também atuam como solutos osmoticamente ativos no tecido radicular. No ápice da raiz, onde o floema ainda não está desenvolvido, o movimento de carboidratos depende da difusão simplástica e é relativamente lento (Bret-Harte e Silk, 1994). As baixas taxas de divisão celular no centro quiescente podem resultar do fato de que os carboidratos chegam em quantidades insuficientes a esta região centralmente localizada ou que esta área é mantida em um estado oxidado (ver **Ensaio 5.2 na Internet**).

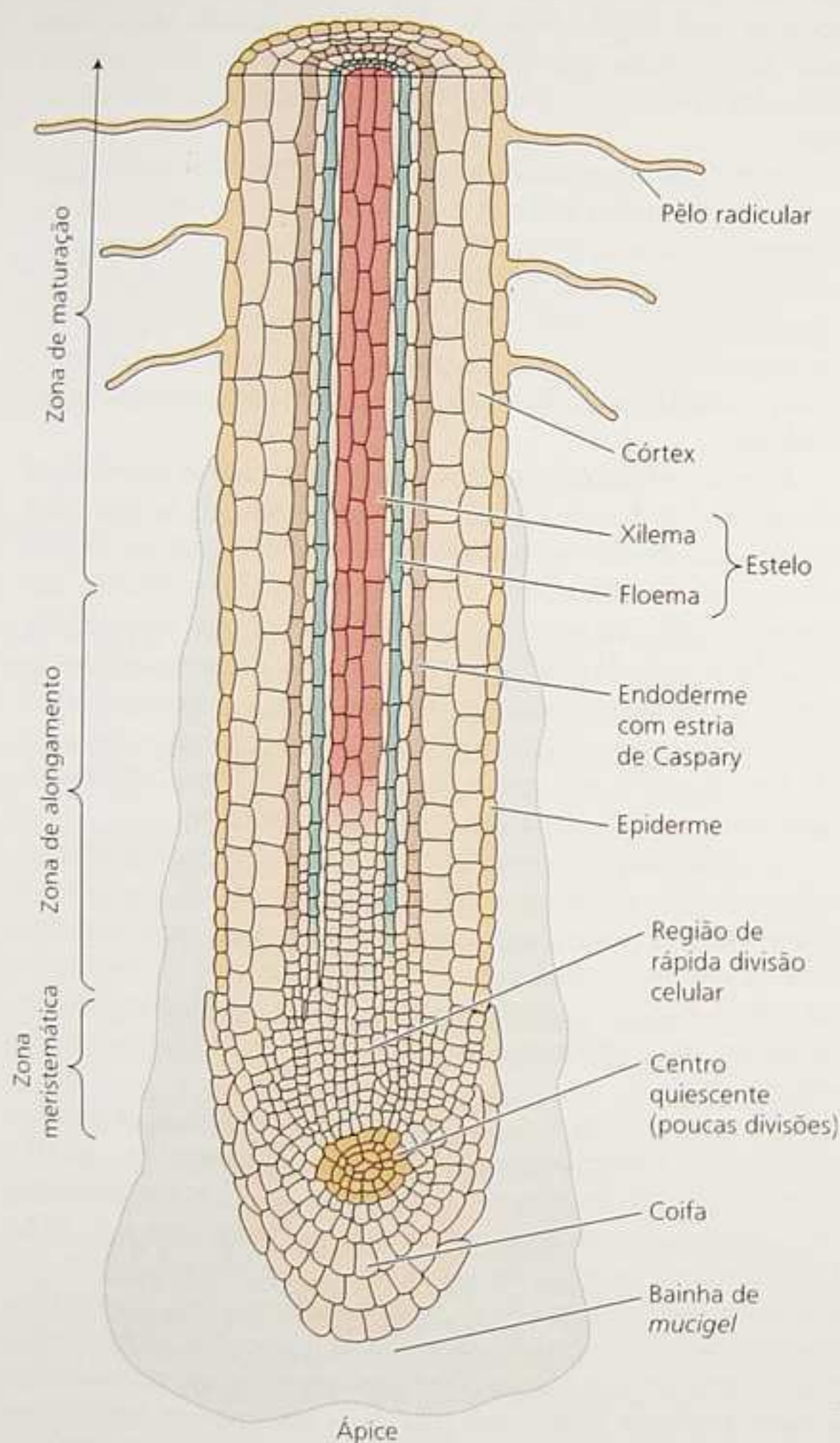



FIGURA 5.8 Seção longitudinal diagramática da região apical da raiz. As células meristemáticas estão localizadas próximas ao ápice radicular. Estas células geram a coifa e os tecidos superiores da raiz. Na zona de alongamento, as células se diferenciam para produzir xilema, floema e córtex. Pêlos radiculares, formados em células epidérmicas, aparecem primeiro na zona de maturação.

Os pêlos radiculares, com suas grandes áreas de superfície para a absorção de água e solutos, aparecem primeiro na **zona de maturação** (ver Figura 5.8). É nesta zona que o xilema desenvolve a capacidade de transportar quantidades substanciais de água e solutos para a parte aérea.

Áreas diferentes da raiz absorvem íons minerais distintos

O ponto preciso de entrada dos minerais para dentro do sistema radicular tem sido um tópico de considerável interesse. Muitos pesquisadores consideram que os nutrientes são absorvidos somente nas regiões apicais dos eixos radiculares ou ramificações (Bar-Yosef e cols., 1972); outros consideram que os nutrientes são absorvidos ao longo de toda a superfície radicular (Nye e Tinker, 1977). Evidências experimentais sustentam as duas possibilidades, dependendo da espécie vegetal e do nutriente sob investigação:

- A absorção radicular de cálcio na cevada parece ser restrita à região apical.
- O ferro pode ser absorvido ou na região apical, como na cevada (Clarkson, 1985), ou ao longo de toda a superfície radicular, como no milho (Kashirad e cols., 1973).
- O potássio, o nitrato, o amônio e o fosfato podem ser absorvidos livremente em todos os locais da superfície radicular (Clarkson, 1985), enquanto no milho a zona de alongamento tem taxas máximas de acúmulo de potássio.
- No milho e no arroz, o ápice radicular absorve amônio mais rapidamente do que a zona de alongamento (Colmer e Bloom, 1998).
- Em muitas espécies, os pêlos radiculares são os mais ativos na absorção de fosfato (Fohse e cols., 1991).

As altas taxas de absorção de nutrientes nas zonas apicais da raiz resultam da forte demanda por nutrientes nesses tecidos e da disponibilidade relativamente alta de nutrientes no solo que as circunda. Por exemplo, o alongamento celular depende do acúmulo de nutrientes como potássio, cloro e nitrato para aumentar a pressão osmótica dentro das células (ver Capítulo 15). O amônio é a fonte preferencial de nitrogênio para sustentar a divisão celular no meristema, pois os tecidos meristemátios são limitados na disponibilidade de carboidratos e a assimilação de amônio consome menos energia que a de nitrato (ver Capítulo 12). O ápice radicular e os pêlos radiculares crescem em solo inexplorado, onde os nutrientes ainda não foram esgotados.

Dentro do solo, os nutrientes podem mover-se em direção à superfície radicular tanto por fluxo de massa quanto por difusão (ver Capítulo 3). No fluxo de massa, os nutrientes são carregados pela água que se move através do solo em direção às raízes. A quantidade de nutrientes fornecida às raízes por fluxo de massa depende da taxa de fluxo de água através do solo em direção à planta, a qual depende das taxas de transpiração* e dos níveis de nutrientes

*N. de T. Na verdade, qualquer processo que gere fluxo de água do solo e direção às raízes resultará no fluxo de massa dos nutrientes dissolvidos na água. A transpiração é a principal fonte geradora desse fluxo de água, mas não a única. O fenômeno da pressão de raiz (ver Capítulo 3) gera um movimento osmótico de água do solo ao xilema radicular, e os nutrientes da solução do solo são assim transportados para junto da superfície radicular também por fluxo de massa.

na solução do solo. Quando tanto a taxa de fluxo de água quanto as concentrações de nutrientes na solução do solo são altas, o fluxo de massa pode desempenhar um importante papel no suprimento de nutrientes.

Na difusão, os nutrientes minerais movem-se de uma região de maior concentração para um local de concentração menor. A absorção de nutrientes pelas raízes reduz a concentração de nutrientes na superfície da raiz, gerando gradientes de concentração na solução do solo que circunda a raiz. A difusão de nutrientes a favor de um gradiente de concentração e o fluxo de massa resultante da transpiração podem aumentar a disponibilidade de nutrientes na superfície radicular.

Quando a absorção de nutrientes pelas raízes é alta e a concentração de nutrientes no solo é baixa, o fluxo de massa supre apenas uma pequena fração das necessidades totais (Mengel e Kirkby, 1987). Sob tais condições, as taxas de difusão limitam o movimento de nutrientes até a superfície da raiz. Quando a difusão é muito baixa para manter concentrações elevadas de nutrientes próximo à raiz, forma-se uma **zona de esgotamento de nutrientes** adjacente à superfície radicular (Figura 5.9), a qual se estende aproximadamente de 0,2 a 2,0 mm da superfície radicular, dependendo da mobilidade do nutriente no solo.

A formação de uma zona de esgotamento informa-nos algo importante sobre a nutrição mineral: devido ao fato de as raízes esgotarem o suprimento mineral na rizosfera, sua eficácia em minerar minerais do solo é determinada não só pela taxa pela qual elas podem remover nutrientes da solução do solo, mas pelo crescimento continuado das mesmas. *Sem crescimento, as raízes iriam rapidamente esgotar o solo adjacente à sua superfície. Portanto, uma aquisição ótima de nutrientes depende da capacidade de absorção dos mesmos e da habilidade das raízes de crescerem em direção a um solo inexplorado.*

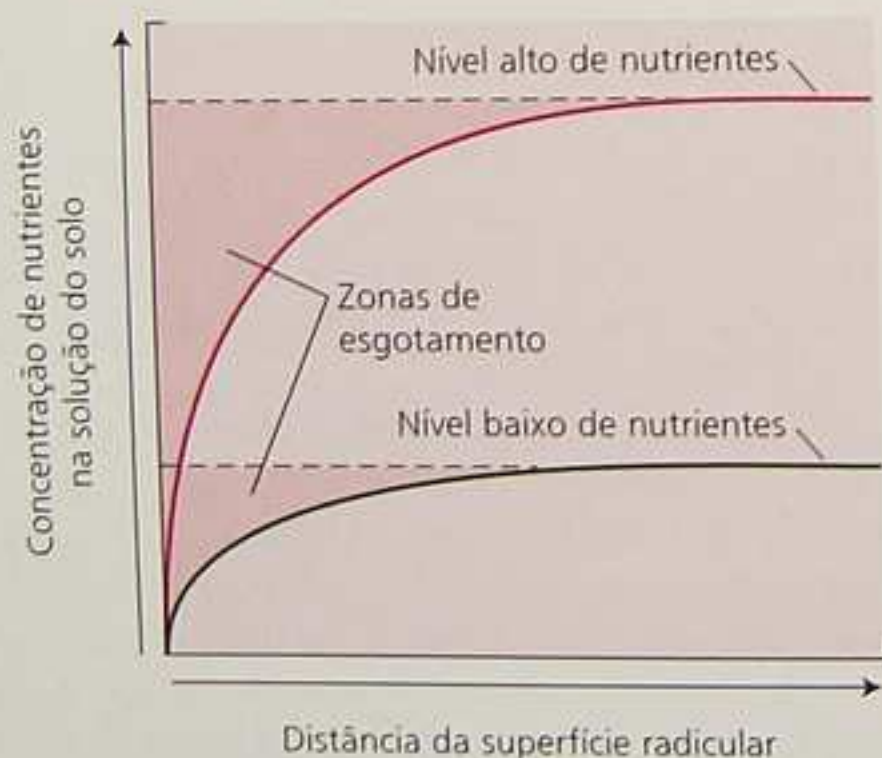



FIGURA 5.9 Formação de uma zona de esgotamento de nutrientes na região do solo adjacente à raiz da planta. Uma zona de esgotamento forma-se quando a taxa de absorção de nutrientes pelas células da raiz excede a taxa de reposição de nutrientes por difusão na solução do solo. Tal esgotamento causa um decréscimo localizado na concentração de nutrientes na área adjacente à superfície radicular (Mengel e Kirkby, 1987).

Os fungos micorrízicos facilitam a absorção de nutrientes pelas raízes

Até agora, nossa discussão centrou-se na obtenção direta de nutrientes minerais pela raiz, mas este processo pode ser modificado pela associação de fungos micorrízicos com o sistema radicular. **Micorrizas** (das palavras gregas "fungo" e "raiz") não são incomuns; na verdade, elas se encontram amplamente dispersas sob condições naturais. A maioria da vegetação no mundo parece ter raízes associadas com fungos micorrízicos: 83% das dicotiledôneas, 79% das monocotiledôneas e todas as gimnospermas formam associações micorrízicas regularmente (Wilcox, 1991).

Por outro lado, plantas das famílias Cruciferae (couve), Chenopodiaceae (espinafre) e Proteaceae (macadâmia), assim como plantas aquáticas, raramente ou nunca têm micorrizas. As micorrizas estão ausentes de raízes de solos muito secos, salinos ou alagados ou onde a fertilidade do solo é extrema, tanto alta quanto baixa. Em particular, plantas cultivadas sob hidroponia e plantas cultivadas jovens em rápido crescimento raramente têm micorrizas.

Os fungos micorrízicos são formados por filamentos tubulares finos chamados hifas. A massa de hifas que forma o corpo do fungo é chamada de micélio. Existem duas classes principais de fungos micorrízicos: micorrizas ectotróficas e micorrizas vesículo-arbusculares (Smith e cols., 1977)*. Classes menores de fungos micorrízicos incluem as micorrizas de ericáceas e orquidáceas, de importância limitada em termos de absorção de nutrientes minerais.

Fungos micorrízicos ectotróficos tipicamente apresentam uma grossa bainha ou "manta" de micélio fúngico ao redor das raízes e parte do micélio penetra entre as células corticais (Figura 5.10). As células corticais em si não são penetradas pelas hifas dos fungos, mas são, em vez disso, circundadas por uma rede de hifas chamada de **rede de Hartig.** Com freqüência, a quantidade de micélio fúngico é tão extensa que sua massa total é comparável àquela das próprias raízes. O micélio fúngico também se estende para o solo, para longe de sua manta compacta, onde forma hifas individuais ou filamentos contendo corpos de frutificação.

A capacidade do sistema radicular de absorver nutrientes é melhorada pela presença de hifas fúngicas externas, muito mais finas do que as raízes da planta e que podem alcançar além das áreas de solo esgotadas em nutrientes próximas às raízes (Clarkson, 1985). Fungos micorrízicos ectotróficos infectam exclusivamente espécies arbóreas, incluindo gimnospermas e angiospermas lenhosas.

Ao contrário dos fungos micorrízicos ectotróficos, os **fungos micorrízicos vesículo-arbusculares** não produzem uma manta compacta de micélio fúngico ao redor da raiz. Em vez disso, as hifas crescem em um arranjo menos denso, tanto dentro da própria raiz quanto se estendendo para fora da mesma em direção ao solo circundante (Figura 5.11). Após penetrar na raiz, ou através da epiderme ou por um pêlo radicular, as hifas não só se estendem pelas regiões entre as células como também penetram células individuais do córtex. Dentro das células, as hifas podem formar estruturas ovais chamadas de **vesículas** e estruturas ramificadas

*N. de T. Atualmente, as micorrizas vesículo-arbusculares são denominadas apenas micorrizas arbusculares, visto que nem todas as associações deste tipo formam as chamadas vesículas.

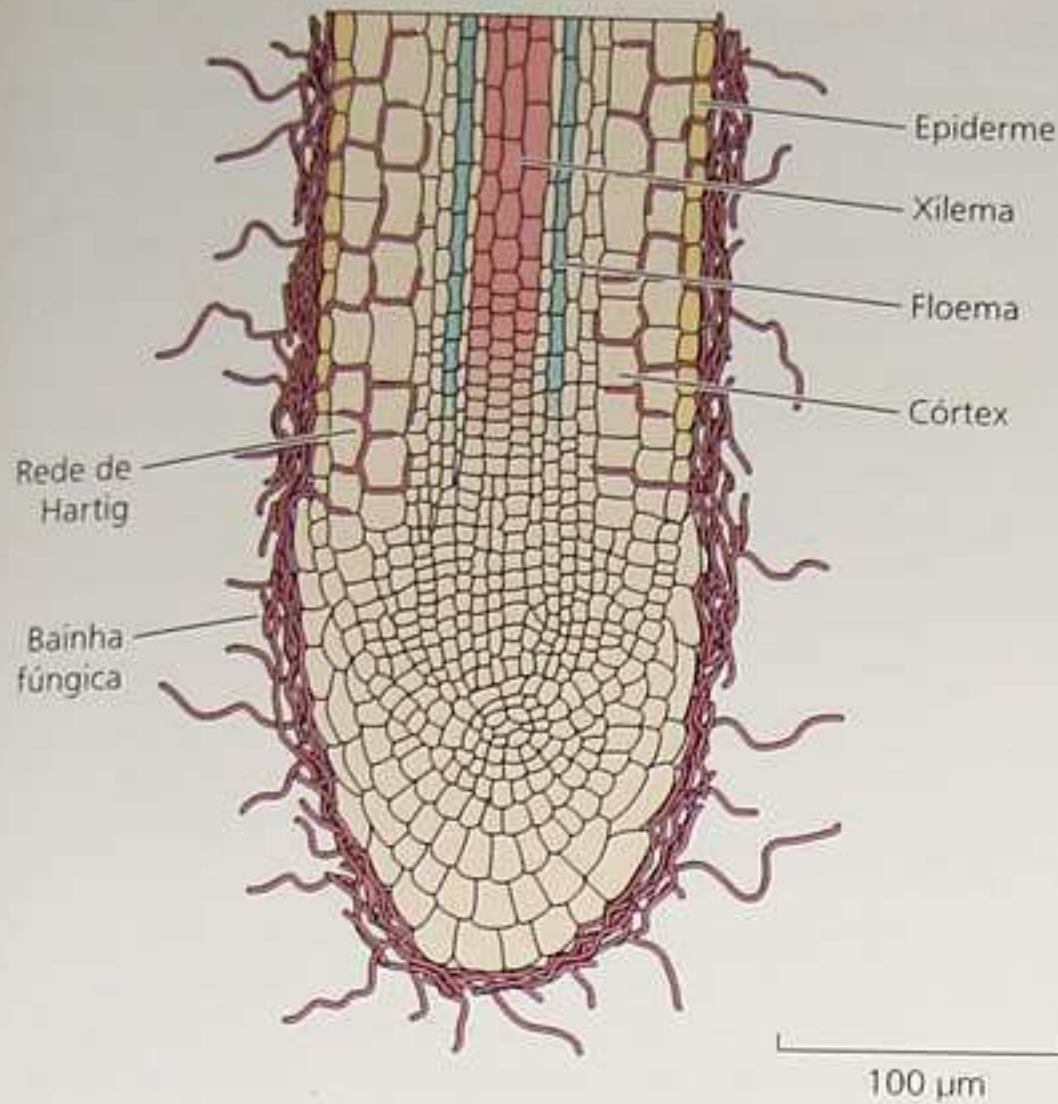



FIGURA 5.10 Raiz infectada com fungos micorrízicos ectotróficos. Na raiz infectada, as hifas fúngicas circundam a raiz para produzir uma densa bainha fúngica e penetrar os espaços intercelulares do córtex para formar a rede de Hartig. A massa total de hifas fúngicas pode ser comparável à massa da própria raiz (Rovira e cols., 1983).

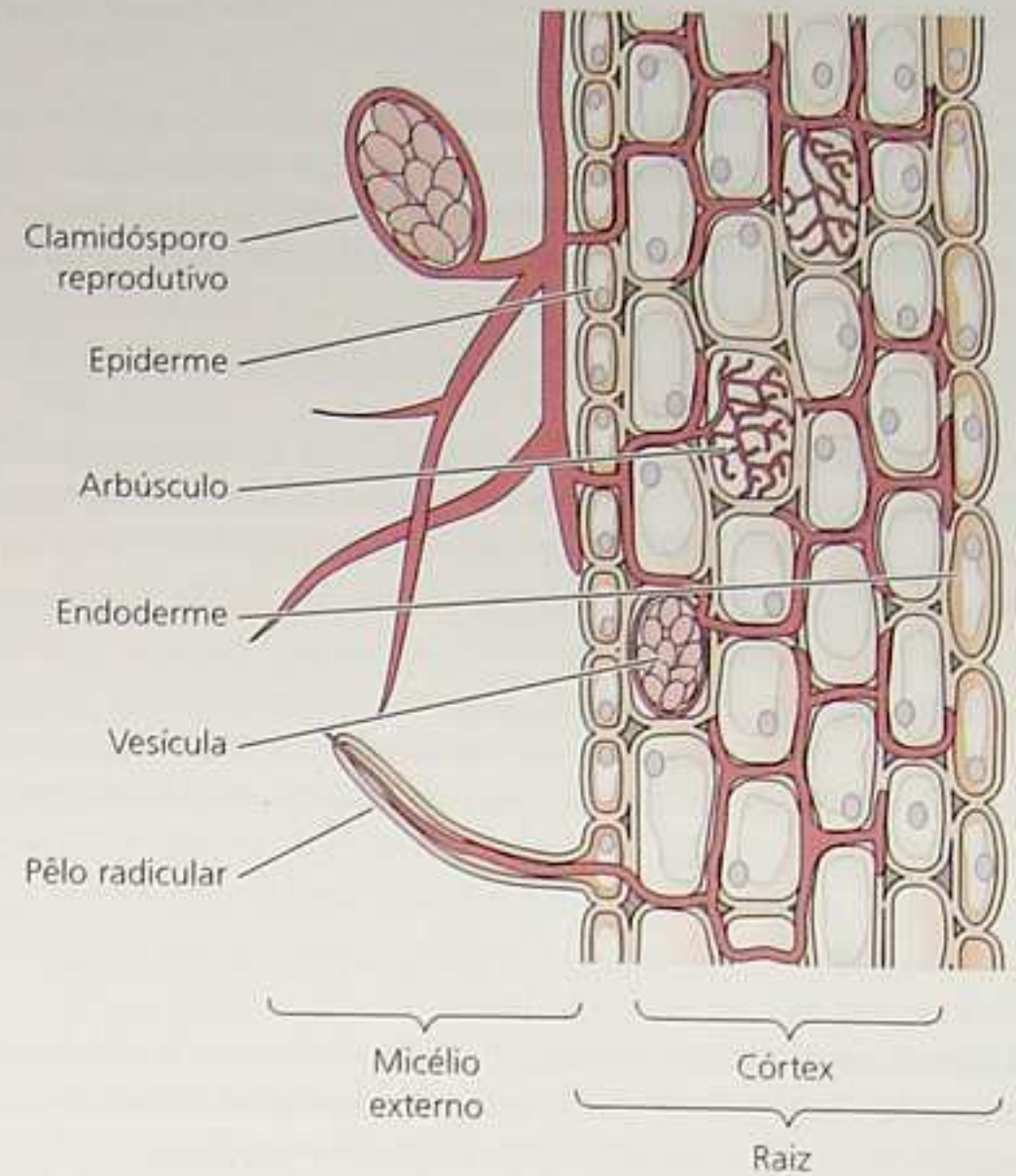



FIGURA 5.11 Associação entre fungos micorrízicos vesículo-arbusculares com uma seção de raiz vegetal. As hifas do fungo crescem nos espaços intercelulares das paredes do córtex e penetram células corticais individuais. À medida que elas se estendem dentro da célula, não rompem a membrana plasmática ou o tonoplasto da célula hospedeira. Em vez disto, a hifa é circundada por essas membranas e forma estruturas conhecidas como arbúsculos, que participam da troca de íons entre a planta hospedeira e o fungo (Mauseth, 1988).

denominadas **arbúsculos.** Os arbúsculos parecem ser os locais de transferência de nutrientes entre o fungo e a planta hospedeira.

Fora da raiz, o micélio externo pode se estender vários centímetros para longe da raiz e conter estruturas que sustentam esporos. Ao contrário das micorrizas ectotróficas, as micorrizas vesículo-arbusculares formam apenas uma pequena massa de material fúngico, que provavelmente não excede 10% da massa radicular. Micorrizas vesículo-arbusculares associam-se com as raízes da maioria das espécies de angiospermas herbáceas (Smith e cols., 1997).

A associação de micorrizas vesículo-arbusculares com as raízes de plantas facilita a absorção de fósforo e de metais-traço, como zinco e cobre. Por se estender além da zona de esgotamento de fósforo ao redor das raízes, o micélio externo melhora a absorção de fósforo. Os cálculos mostram que uma raiz associada com fungos micorrízicos pode transportar fosfato em uma taxa quatro vezes maior do que aquela de uma raiz não associada com micorrizas (Nye e Tinker, 1977). O micélio externo das micorrizas ectotróficas também pode absorver fosfato e torná-lo disponível à planta. Além disso, tem sido sugerido que as micorrizas ectotróficas proliferam na serrapilheira orgânica do solo e hidrolisam fósforo orgânico para transferência às raízes (Smith e cols., 1997).

Os nutrientes se movem dos fungos micorrízicos às células da raiz

Pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual os nutrientes minerais absorvidos pelos fungos micorrízicos são transferidos às células das raízes dos vegetais. Com as micorrizas ectotróficas, os fosfatos inorgânicos podem simplesmente difundir-se das hifas na rede de Hartig e serem absorvidos pelas células corticais da raiz. Com as micorrizas vesículo-arbusculares, a situação pode ser mais complexa. Os nutrientes podem se difundir de arbúsculos intactos para as células corticais. De maneira alternativa, devido ao fato de alguns arbúsculos radiculares estarem continuamente se degenerando enquanto novos se formam, arbúsculos em degeneração podem liberar seus conteúdos internos para as células radiculares do hospedeiro.

Um fator-chave na determinação da extensão da associação micorrízica com a raiz da planta é o estado nutricional da hospedeira. A deficiência moderada de um nutriente como o fósforo tende a promover a infecção, enquanto plantas com nutrientes abundantes tendem a suprimir a infecção micorrízica.

Associações micorrízicas em solos bem fertilizados podem mudar de uma relação simbiótica para uma parasítica, na qual o fungo ainda obtém carboidratos da planta hospedeira, mas esta não mais se beneficia com a melhor eficiência de absorção de nutrientes. Sob tais condições, a planta hospedeira pode tratar o fungo micorrízico da forma como trata os outros patógenos (Bundrett, 1991; Marschner, 1995).

RESUMO

As plantas são organismos autotróficos capazes de usar a energia do sol para sintetizar todos os seus componentes, a partir do dióxido de carbono, água e nutrientes minerais. Estudos de nutrição mineral têm mostrado que elementos minerais específicos são essenciais para a vida vegetal. Tais elementos são classificados como macro ou micronutrientes, dependendo da quantidade relativa encontrada no tecido vegetal.

Alguns sintomas visuais são diagnósticos de deficiências de nutrientes específicos em plantas superiores. Distúrbios nutricionais ocorrem porque os nutrientes têm papéis importantes no metabolismo vegetal. Eles atuam como componentes de compostos orgânicos, na armazenagem de energia, nas estruturas vegetais, como cofatores enzimáticos e nas reações de transferência de elétrons. A nutrição mineral pode ser estudada por meio do uso da hidroponia ou da aeroponia, as quais permitem a caracterização de exigências nutricionais específicas. Análises de solo e de tecidos vegetais podem fornecer informações a respeito do estado nutricional do sistema planta-solo e podem sugerir ações corretivas para evitar deficiências ou toxicidades.

Quando as plantas cultivadas desenvolvem-se sob condições modernas de alta produtividade, quantidades substanciais de nutrientes são removidas do solo. Para impedir o surgimento de deficiências, os nutrientes podem ser adicionados de volta ao solo por meio de fertilizantes. Os fertilizantes que fornecem nutrientes sob forma inorgânica são chamados de fertilizantes químicos; aqueles que derivam de resíduos vegetais ou animais são considerados fertilizantes orgânicos. Em ambos os casos, as plantas absorvem os nutrientes principalmente como íons inorgânicos. A maioria dos fertilizantes é aplicado no solo, mas alguns são aspergidos sobre as folhas.

O solo é um substrato complexo — física, química e biologicamente. O tamanho das partículas do solo e a capacidade de troca de cátions do mesmo determinam a dimensão na qual um solo fornece um reservatório de água e nutrientes. O pH do solo também tem uma grande influência na disponibilidade de elementos minerais às plantas.

Se elementos minerais, em especial o sódio ou metais pesados, estão presentes em excesso no solo, o crescimento vegetal pode ser negativamente afetado. Algumas plantas são capazes de tolerar o excesso de elementos minerais e poucas espécies — as halófitas, por exemplo, no caso do sódio — crescem sob essas condições extremas.

Para obter os nutrientes do solo, as plantas desenvolvem extensos sistemas radiculares. As raízes têm estrutura relativamente simples, com simetria radial e poucos tipos de células diferenciadas. As raízes esgotam continuamente os nutrientes do solo imediatamente ao redor das mesmas e tal estrutura simples pode permitir o rápido crescimento em zonas inexploradas de solo.

As raízes das plantas comumente formam associações com fungos micorrízicos. As hifas finas das micorrizas aumentam o alcance das raízes no solo circundante e facilitam a obtenção de elementos minerais, em particular aqueles como o fósforo, que são relativamente imóveis no solo. Em troca, as plantas fornecem carboidratos às micorrizas. As plantas tendem a suprimir as associações micorrízicas sob condições de alta disponibilidade de nutrientes.

Material da Internet

Tópicos da Internet

5.1 Sintomas de deficiências para minerais essenciais
Os sintomas de deficiência são característicos para cada elemento essencial e podem ser usados no diagnóstico da deficiência. As fotos coloridas ilustram sintomas de deficiências para cada elemento essencial em tomateiro.

5.2 Observando as raízes debaixo do solo
O estudo de raízes que crescem sob condições naturais requer métodos de observação das raízes debaixo do solo. O que há de mais moderno em técnicas é descrito neste ensaio.

Ensaios da Internet

5.1 Das refeições para os metais e então de volta
O acúmulo de metais pesados pelas plantas é tóxico. O entendimento dos processos moleculares envolvidos está auxiliando a desenvolver culturas fitorremediadoras melhores.

5.2 Controle redox do centro quiescente da raiz
O estado redox do centro quiescente parece controlar o ciclo dessas células.

Referências bibliográficas

Amon, D. I., and Stout, P. R. (1939) The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper. *Plant Physiol.* 14: 371-375.

Asher, C. J., and Edwards, D. G. (1983) Modern solution culture techniques. In *Inorganic Plant Nutrition* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 15B), A. Lduchli and R. L. Bieleski, eds., Springer, Berlin, pp. 94-119.

Bar-Yosef, B., Kafkafi, U., and Bresler, E. (1972) Uptake of phosphorus by plants growing under field conditions. I. Theoretical model and experimental determination of its parameters. *Soil Sci.* 36:783-800.

Berry, W. L., and Wallace, A. (1981) Toxicity: The concept and relationship to the dose response curve. *J. Plant Nutr.* 3: 13-19.

Bloom, A. J. (1994) Crop acquisition of ammonium and nitrate. In *Physiology and Determination of Crop Yield*, K. J. Boote, J. M. Bennett, T. R. Sinclair, and G. M. Paulsen, eds., Soil Science Society of America, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, pp. 303-309.

Bloom, A. J., Jackson, L. E., and Smart, D. R. (1993) Root growth as a function of ammonium and nitrate in the root zone. *Plant Cell Environ.* 16:199-206.

Bouma, D. (1983) Diagnosis of mineral deficiencies using plant tests. In *Inorganic Plant Nutrition* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 15B), A. Läuchli and R. L. Bieleski, eds., Springer, Berlin, pp.120-146.

Brady N. C. (1974) *The Nature and Properties of Soils*, 8th ed. Macmillan, New York.

Bret-Harte, M. S., and Silk, W. K. (1994) Nonvascular, symplasmic diffusion of sucrose cannot satisfy the carbon demands of growth in the primary root tip of Zea mays L. *Plant Physiol.* 105:19-33.

Brundrett, M. C. (1991) Mycorrhizas in natural *ecosystems. Adv. Ecol. Res.* 21: 171-313.

Clarke, S. M., and Eaton-Rye, J. J. (2000) Amino acid deletions in loop C of the chlorophyll a-binding protein CP47 alter the chloride requirement and/or prevent the assembly of photosystem II. *Plant Mol. Biol.* 44: 591-601.

Clarkson, D. T. (1985) Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 77-116.

Cohner, T. D., and Bloom, A. J. (1998) A comparison of net NH_4, and NO_3 fluxes along roots of rice and maize. *Plant Cell Environ.* 21: 240-246.

Cooper, A. (1979) *The ABC of NFT: Nutrient Film Technique: The World's First Method of Crop Production without a Solid Rooting Medium.* Grower Books, London.

Dittmer, H. J. (1937) A quantitative study of the roots and root hairs of a winter rye plant (Secale cereale). *Am. J. Bot.* 24: 417-420.

Epstein, E. (1972) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives.* Wiley, New York.

Epstein, E. (1999) Silicon. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-664.

Evans, H. J., and Sorger, G. J. (1966) Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 17: 47-76.

Foehse, D., Claassen, N., and Jungk, A. (1991) Phosphorus efficiency of plants. II. Significance of root radius, root hairs and cationanion balance for phosphorus influx in seven plant species. *Plant Soil* 132: 261-272.

Gericke, W. F. (1937) Hydroponics — Crop production in liquid culture media. *Science* 85: 177-178.

Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 659-693.

Harling, H., Czaja, I., Schell, J., and Walden, R. (1997) A plant cation-chloride co-transporter promoting auxin-independent tobacco protoplast division. *EMBO J.* 16: 5855-5866.

Hasegawa, P M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.

Hepler, P. K., and Wayne, R. O. (1985) Calcium and plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 397-140.

Johnstone, M., Grof, C. P L., and Brownell, P. F. (1988) The effect of sodium nutrition on the pool sizes of intermediates of the C_4 photosynthetic pathway. *Aust. J. Plant Physiol.* 15: 749-760.

Kashirad, A., Marschner, H., and Richter, C. H. (1973) Absorption and translocation of 59_{Fe} from various parts of the com plant. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 134: 136-147.

Loomis, R. S., and Connor, D. J. (1992) *Crop Ecology: Productivity and Management in Agricultural Systems.* Cambridge University Press, Cambridge.

Lucas, R. E., and Davis, J. E (1961) Relationships between pH values of organic soils and availabilities of 12 plant nutrients. *Soil Sci.* 92: 177-182.

Macek, T., Mackova, M., and Kas, J. (2000) Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotech. Adv.* 18:23-34.

Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants,* 2nd ed. Academic Press, London.

Mauseth, J. D. (1988) *Plant Anatomy.* Benjamin/Cummings Pub. Co., Menlo Park, CA.

Mengel, K., and Kirkby, E. A. (1987) *Principles of Plant Nutrition.* International Potash Institute, Worblaufen-Bern, Switzerland.

Nolan, B. T. and Stoner, J. D. (2000) Nutrients in groundwater of the center conterminous United States 1992-1995. *Environ. Sci. Tech.* 34:1156-1165.

Nye, P H., and Tinker, P B. (1977) *Solute Movement in the Soil-Root System.* University of California Press, Berkeley.

Oh, S.-H., Cho, S.-W, Kwon, T.-H., and Yang, M.-S. (1996) Purification and characterization of phytoferritin. *J. Biochem. Mol. Biol.* 29: 540-544.

Raven, J. A., and Smith, E A. (1976) Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intracellular pH regulation. *New Phytol.* 76: 415-431.

Rovira, A. D., Bowen, C. D., and Foster, R. C. (1983) The significance of rhizosphere microflora and mycorrhizas in plant nutrition. In *Inorganic Plant Nutrition* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 15B) A. Lauchli and R. L. Bieleskis, eds., Springer, Berlin, pp. 61-93.

Russell, R. S. (1977) *Plant Root Systems: Their Function and Interaction with the Soil.* McGraw-Hill, London.

Sanders, D., Brownlee, C., and Harper J. F. (1999) Communicating with calcium. *Plant Cell* 11: 691-706.

Sharp, R. E., Hsiao, T. C., and Silk, W. K. (1990) Growth of the maize primary root at low water potentials. 2. Role of growth and deposition of hexose and potassium in osmotic adjustment. *Plant Physiol.* 93:1337-1346.

Shelp, B. J. (1993) Physiology and biochemistry of boron in plants. In *Boron and Its Role in Crop Production,* U. C. Gupta, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 53-85.

Sievers, R. E., and Bailar, J. C., Jr. (1962) Some metal chelates of ethylenediaminetetraacetic acid, diethylenetriaminepentaacetic acid, and triethylenetriaminehexaacetic acid. *Inorganic Chem. 1:* 174-182.

Smith, S. E., Read, D. J., and Harley, J. L. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, San Diego, CA.

Stewart, G. R., and Ahmad, I. (1983) Adaptation to salinity in angiosperm halophytes. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants,* D. A. Robb and W. S. Pierpoint, eds., Academic Press, New York, pp. 33-50.

Taylor, A. R., and Bloom, A. J. (1998) Ammonium, nitrate and proton fluxes along the maize root. *Plant Cell Environ.* 21: 1255-1263.

Weathers, P J., and Zobel, R. W. (1992) Aeroponics for the culture of organisms, tissues, and cells. *Biotech. Adv.* 10: 93-115.

Weaver, J. E. (1926) *Root Development of Field Crops.* McGraw-Hill, New York.

Wilcox, H. E. (1991) Mycorrhizae. In *Plant Roots: The Hidden Half,* Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, eds., Marcel Dekker, New York, pp. 731-765.

Ziegler, H. (1987) The evolution of stomata. In *Stomatal Function,* E. Zeiger, G. Farquhar, and I. Cowan, eds., Stanford University Press, Stanford, CA, pp. 29-57.

Capítulo

6 Transporte de solutos

AS CÉLULAS VEGETAIS SÃO SEPARADAS do seu ambiente por uma membrana plasmática cuja espessura é de apenas duas camadas de moléculas de lipídeos. Essa fina camada separa um ambiente interno relativamente constante do entorno altamente variável. Além de formar uma barreira hidrofóbica à difusão, tem a função de facilitar e regular continuamente o trânsito de íons e moléculas selecionados para dentro e para fora, à medida que a célula absorve nutrientes, exporta restos e regula sua pressão de turgor. O mesmo é válido para membranas internas, as quais separam os diversos compartimentos dentro de cada célula.

Como único contato da célula com o ambiente ao seu redor, também cabe à membrana plasmática transmitir informação sobre o seu ambiente físico, os sinais moleculares oriundos de outras células e a presença de patógenos invasores. Normalmente, tais processos de transdução de sinal são mediados por mudanças no fluxo iônico através da membrana.

O movimento molecular e iônico de um local para outro é conhecido como **transporte.** O transporte local de solutos para dentro das células ou no interior das mesmas é regulado principalmente por membranas. O transporte de maior escala, entre a planta e o ambiente ou entre as folhas e as raízes, por exemplo, também é controlado pelo transporte de membranas celulares. Por exemplo, o transporte da sacarose da folha à raiz através do floema, denominado *translocação*, é governado e regulado pelo transporte de membrana para dentro das células do floema na folha e do floema para as células de armazenagem da raiz (ver Capítulo 10).

Neste capítulo, abordaremos, em primeiro lugar, os princípios físicos e químicos que governam os movimentos de moléculas em solução. A seguir, serão mostrados como tais princípios aplicam-se às membranas e aos sistemas biológicos. Também serão discutidos os mecanismos moleculares do transporte em células vivas e a grande variedade de proteínas de transporte de membrana responsáveis pelas propriedades particulares de transporte de células vegetais. Por fim, será analisada a rota que os íons seguem, quando eles entram na raiz, assim como o mecanismo de carregamento do xilema, processo pelo qual os íons são liberados dentro dos elementos de vaso e traqueídes.

TRANSPORTE PASSIVO E ATIVO

De acordo com a primeira lei de Fick (ver Equação 3.1), o movimento de moléculas por difusão sempre ocorre espontaneamente, ao longo de um gradiente de concentração ou de potencial químico (ver Capítulo 2 na Internet), até que o equilíbrio seja atingido. O movimento espontâneo de moléculas "montanha abaixo" é denominado **transporte passivo.** Em equilíbrio, nenhum movimento líquido adicional de soluto pode ocorrer sem a introdução de uma força propulsora.

O movimento de substâncias contra um gradiente químico (p. ex., em direção a uma concentração maior) é chamado de **transporte ativo.** Ele não é espontâneo e requer a realização de trabalho no sistema, por meio da aplicação de energia celular. Uma forma (mas não a única) de executar esta tarefa é acoplar o transporte à hidrólise de ATP.

Lembre-se de que no Capítulo 3 pôde ser calculada a força propulsora para a difusão, ou, em vez disso, a adição de energia necessária para movimentar substâncias contra um gradiente, medindo-se o gradiente de energia potencial, que é normalmente uma simples função da diferença de concentração. O transporte biológico pode ser comandado por quatro forças: concentração, pressão hidrostática, gravidade e campos elétricos (no entanto, recorde-se do Capítulo 3 que, em sistemas biológicos, a gravidade raramente contribui substancialmente para a força que governa o transporte).

O **potencial químico** para qualquer soluto é definido como a soma dos potenciais de concentração, elétrico e hidrostático (e do potencial químico sob condições-padrão):

$$\tilde{\mu}_j = \mu_j^* + RT \ln C_j + z_j FE + \bar{V}_j P \quad (6.1)$$

$\tilde{\mu}_j$	μ_j^*	$RT \ln C_j$	$z_j FE$	$\bar{V}_j P$
Potencial químico para um determinado soluto, *j*	Potencial químico de *j* sob condições-padrão	Componente concentração (atividade)	Componente potencial elétrico	Componente pressão hidrostática

Aqui $\tilde{\mu}_j$ é o potencial químico da espécie de soluto *j* em *joules* por mol (J mol^{-1}), μ_j^* é o seu potencial químico sob condições-padrão (um fator de correção que será cancelado em futuras equações e que, assim, pode ser ignorado), *R* é a constante universal dos gases, *T* é a temperatura absoluta e Cj, a concentração (mais precisamente a atividade) de *j*.

O termo elétrico, z_jFE, aplica-se somente a íons; *z* é a carga eletrostática do íon (+1 para cátions monovalentes, –1 para ânions monovalentes, +2 para cátions divalentes e assim por diante), *F* é a constante de Faraday (equivalente à carga elétrica em 1 mol de prótons) e *E* é o potencial elétrico geral da solução (com relação à terra). O termo final, $\bar{V}_jP$, expressa a contribuição do volume molal parcial de *j* ($\bar{V}_j$) e da pressão (*P*) para o potencial químico de *j* (o volume molal parcial de *j* é a mudança em volume por mol de substância *j* adicionada ao sistema, para uma adição infinitesimal).

Este termo final, $\bar{V}_jP$, contribui muito menos para μ_j do que os termos concentração e elétrico, exceto no caso — muito importante — de movimentos osmóticos de água. Conforme discutido no Capítulo 3, o potencial químico da água (i. é, o potencial hídrico) depende da concentração de solutos dissolvidos e da pressão hidrostática no sistema.

A importância do conceito de potencial químico é que ele soma todas as forças que podem agir sobre uma molécula para governar o transporte líquido (Nobel, 1991).

Em geral, a difusão ou o transporte passivo sempre movimenta as moléculas de áreas de maior potencial químico para áreas de menor potencial químico. O movimento contra um gradiente de potencial químico é indicativo de transporte ativo (Figura 6.1).

Se se tomar a difusão de sacarose através de uma membrana permeável como exemplo, pode-se acuradamente fazer uma aproximação do potencial químico da sacarose em qualquer compartimento, usando apenas o termo concentração (a não ser que uma solução seja muito concentrada, fazendo com que se acumule pressão hidrostática). A partir da Equação 6.1, o potencial químico da sacarose dentro de uma célula pode ser estimado como segue (nas próximas três equações, o subscrito *s* refere-se à sacarose e os sobrescritos *i* e *o* referem-se a dentro e fora, respectivamente):

$$\tilde{\mu}_s^i = \mu_s^* + RT \ln C_s^i \quad (6.2)$$

$\tilde{\mu}_s^i$	μ_s^*	$RT \ln C_s^i$
Potencial químico de solução de sacarose dentro da célula	Potencial químico da solução de sacarose sob condições-padrão	Componente concentração

O potencial químico da sacarose fora da célula é assim calculado:

$$\tilde{\mu}_s^o = \tilde{\mu}_s^* + RT \ln C_s^o \quad (6.3)$$

É possível calcular a diferença no potencial químico de sacarose entre as soluções dentro e fora da célula, $\Delta\tilde{\mu}_s$, independente do mecanismo de transporte. Para acertar os sinais, lembre-se de que, para movimentos para dentro, a sacarose está sendo removida (–) do lado de fora da célula e adicionada (+) para o lado de dentro, de forma que a mudança na energia livre em *joules* por mol de sacarose transportada será como segue:

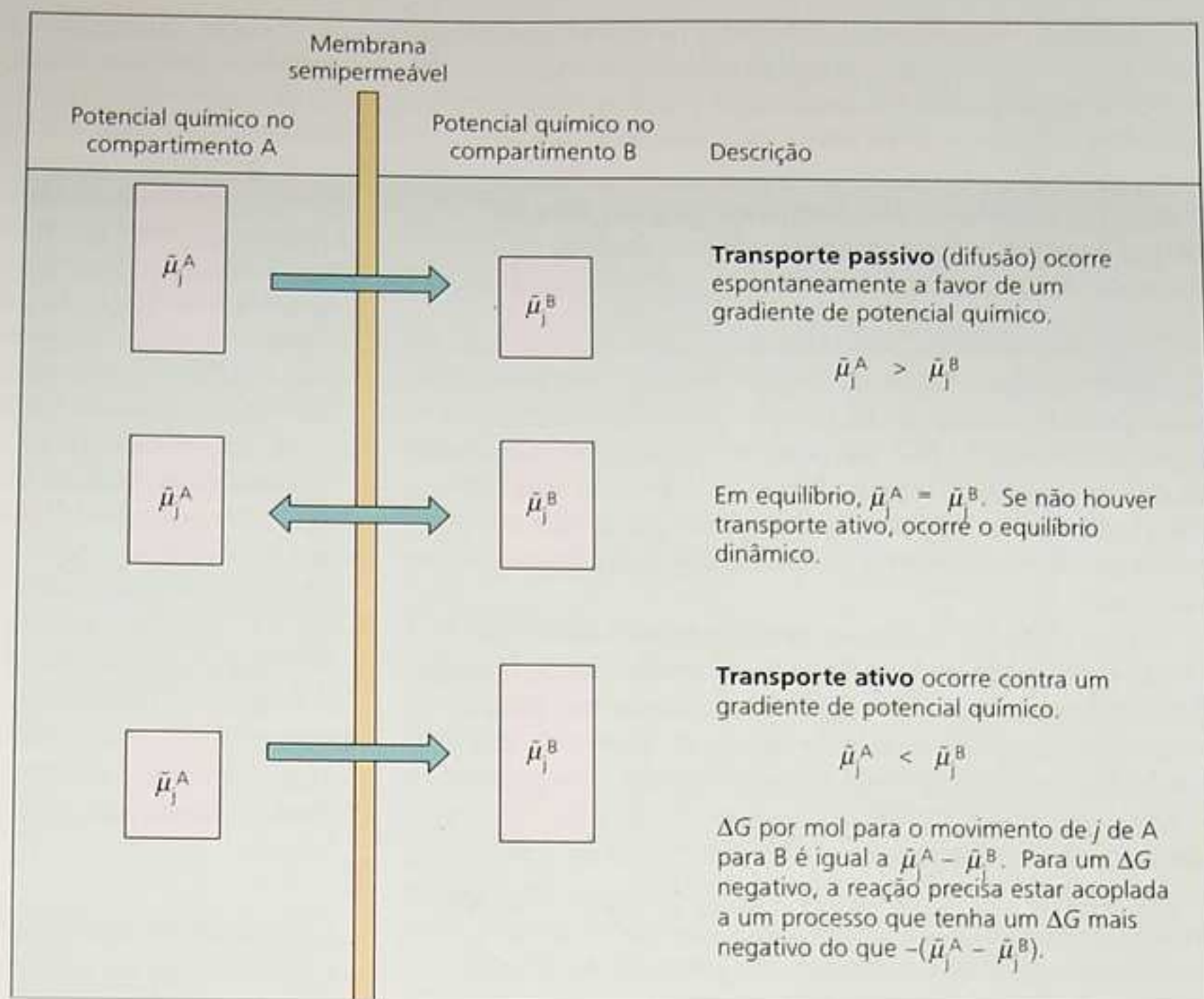
$$\Delta\tilde{\mu}_s = \tilde{\mu}_s^i - \tilde{\mu}_s^o \quad (6.4)$$

Substituindo os termos das Equações 6.2 e 6.3 na Equação 6.4, tem-se o seguinte:

$$\begin{aligned}\Delta\tilde{\mu}_s &= \left(\mu_s^* + RT \ln C_s^i\right) - \left(\mu_s^* + RT \ln C_s^o\right)\\ &= RT\left(\ln C_s^i - \ln C_s^o\right)\\ &= RT \ln \frac{C_s^i}{C_s^o}\end{aligned} \quad (6.5)$$

Se essa diferença em potencial químico é negativa, a sacarose pode se movimentar para dentro espontaneamente (desde que a membrana tenha uma permeabilidade finita à sacarose; ver a próxima seção). Em outras palavras, a força propulsora ($\Delta\tilde{\mu}_s$) para a difusão de soluto está relacionada à magnitude do gradiente de concentração (C_s^i/C_s^o).

Se o soluto possui uma carga elétrica (como o íon potássio), o componente elétrico do potencial químico também precisa ser con-

FIGURA 6.1 Relação entre o potencial químico, $\tilde{\mu}$, e o transporte de moléculas através de uma barreira de permeabilidade. O movimento líquido das espécies moleculares *j* entre os compartimentos A e B depende da magnitude relativa do potencial químico de *j* em cada compartimento, aqui representado pelo tamanho dos retângulos. O movimento a favor de um potencial químico ocorre espontaneamente e é chamado de transporte passivo; o movimento contra um gradiente requer energia e é denominado transporte ativo.

siderado. Suponha que a membrana seja permeável ao K^+ e Cl^- em vez da sacarose. Como as espécies iônicas (K^+ e Cl^-) difundem-se independentemente, cada uma tem seu próprio potencial químico. Assim, para a difusão do K^+ para dentro,

$$\Delta\tilde{\mu}_K = \tilde{\mu}_K^{\,i} - \tilde{\mu}_K^{\,o} \qquad (6.6)$$

Substituindo os termos apropriados da Equação 6.1 para a Equação 6.6, obtém-se

$$\Delta\tilde{\mu}_s = (RT \ln [K^+]^i + zFE^i) - (RT \ln [K^+]^o + zFE^o) \qquad (6.7)$$

e, devido ao fato de a carga eletrostática do K^+ ser +1, $z = +1$ e

$$\Delta\tilde{\mu}_K = RT \ln\frac{[K^+]^i}{[K^+]^o} + F(E^i - E^o) \qquad (6.8)$$

A magnitude e o sinal dessa expressão indicarão a força propulsora para a difusão do K^+ através da membrana e sua direção. Uma expressão similar pode ser escrita para o Cl^- (mas lembra-se de que para o Cl^-, $z = -1$).

A Equação 6.8 mostra que íons, como o K^+, difundem-se em resposta tanto a gradientes de concentração ($[K^+]^i/[K^+]^o$) quanto a qualquer diferença de potencial elétrico entre dois compartimentos ($E^i - E^o$). Uma implicação muito importante dessa equação é que íons podem ser movidos passivamente contra seus gradientes de concentração se uma voltagem apropriada (campo elétrico) for aplicada entre dois compartimentos. Pela importância dos campos elétricos no transporte biológico, $\tilde{\mu}$ é comumente chamado de **potencial eletroquímico** e $\Delta\tilde{\mu}$ é a diferença de potencial eletroquímico entre dois compartimentos.

TRANSPORTE DE ÍONS ATRAVÉS DE UMA BARREIRA DE MEMBRANA

Se as duas soluções de KCl do exemplo anterior forem separadas por uma membrana biológica, a difusão é complicada pelo fato que os íons têm de se mover através de membrana, assim como por soluções abertas. A extensão com a qual uma membrana permite o movimento de uma substância é denominada **permeabilidade de membrana**.

Como será discutido mais tarde, a permeabilidade depende da composição da membrana, assim como da natureza química do soluto. De uma forma geral, a permeabilidade pode ser expressa em termos de um coeficiente de difusão para o soluto na membrana. Entretanto, a permeabilidade é influenciada por vários fatores adicionais, como a habilidade de uma substância de penetrar a membrana, os quais são difíceis de medir.

Apesar de sua complexidade teórica, pode-se prontamente medir a permeabilidade, determinando-se a taxa com a qual um soluto passa através de uma membrana sob um conjunto específico de condições. Geralmente, a membrana irá retardar a difusão e, então, reduzir a velocidade com a qual o equilíbrio é atingido. A permeabilidade ou a resistência da própria membrana, no entanto, não pode alterar as condições finais de equilíbrio, o qual ocorre quando $\Delta\tilde{\mu}_j = 0$.

Na seção seguinte serão discutidos os fatores que influenciam a distribuição passiva de íons através de uma membrana. Esses parâmetros podem ser usados para prever a relação entre o gradiente elétrico e o gradiente de concentração de um íon.

Potenciais de difusão são formados quando íons de cargas opostas movimentam-se através de uma membrana com taxas diferentes

Quando sais difundem-se através de uma membrana, um potencial elétrico de membrana (voltagem) pode se desenvolver. Considere-se duas soluções de KCl separadas por uma membrana na Figura 6.2. Os íons K^+ e Cl^- vão permear a membrana independentemente, à medida que eles se difundem a favor de seus respectivos gradientes de potencial eletroquímico, e, a não ser que a membrana seja muito porosa, sua permeabilidade para os dois íons vai diferir.

Como conseqüência dessas permeabilidades diferentes, K^+ e Cl^- vão inicialmente se difundir pela membrana a taxas diferentes. O resultado vai ser uma leve separação de cargas, que instantaneamente criará um potencial elétrico através da membrana. Em sistemas biológicos, as membranas são normalmente mais permeáveis ao K^+ do que ao Cl^-. Conseqüentemente, K^+ vai difundir-se para fora da célula (compartimento A na Figura 6.2) mais rapidamente do que Cl^-, fazendo com que a célula desenvolva uma carga elétrica negativa com relação ao meio. Um potencial que se desenvolve como conseqüência da difusão é denominado **potencial de difusão.**

Compartimento A Compartimento B

Membrana K$^+$ Cl$^-$

Condições iniciais: $[KCl]_A > [KCl]_B$

O potencial de difusão existe até que o equilíbrio químico seja alcançado.

Condições de equilíbrio: $[KCl]_A = [KCl]_B$

No equilíbrio químico, o potencial de difusão é zero.

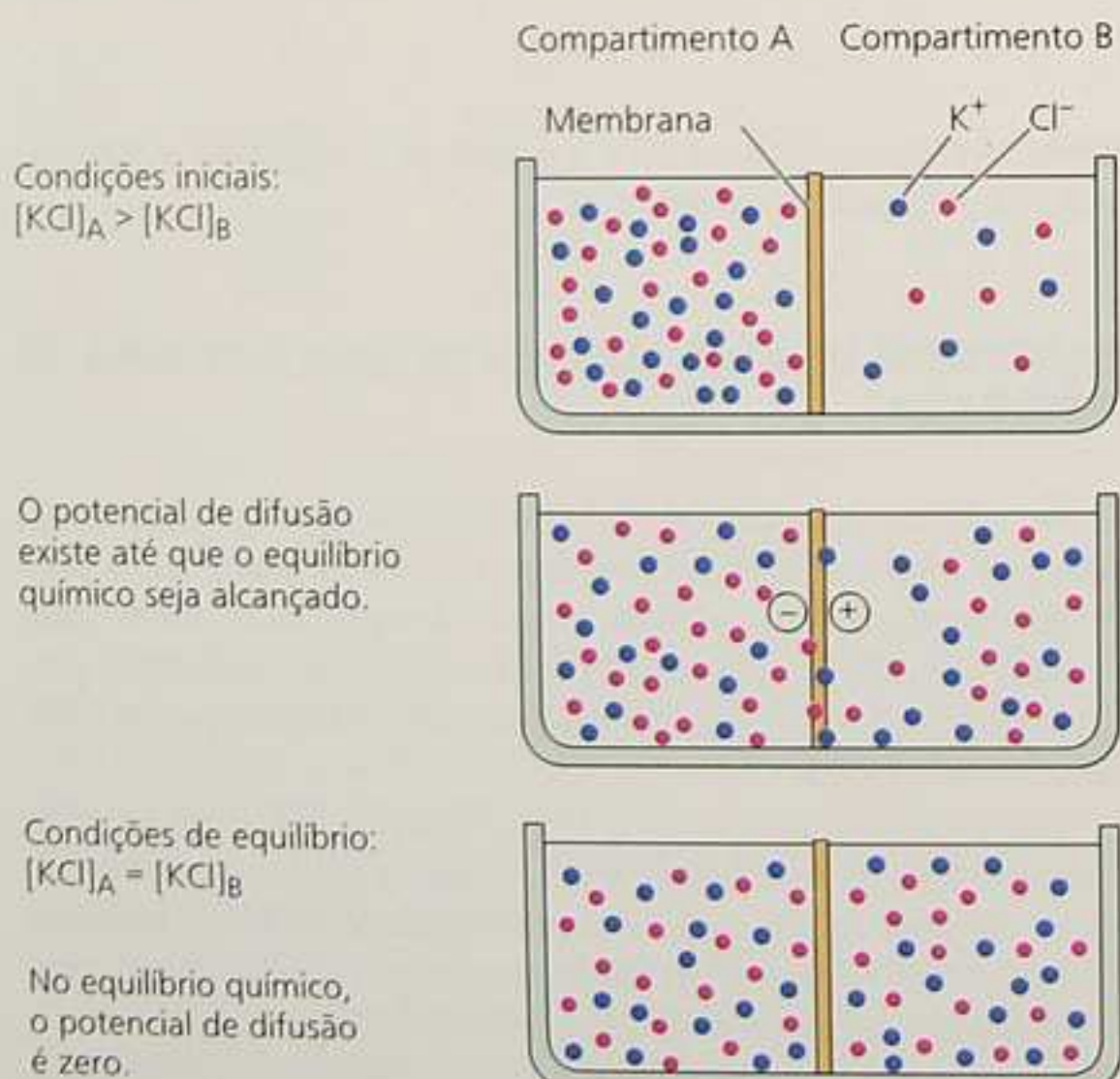



FIGURA 6.2 Desenvolvimento de um potencial de difusão e de uma separação de cargas entre dois compartimentos separados por uma membrana que é preferencialmente permeável ao potássio. Se a concentração de cloreto de potássio é maior no compartimento A ($[KCl]_A > [KCl]_B$), os íons potássio e cloreto vão se difundir a uma taxa maior para o compartimento B, sendo estabelecido um potencial de difusão. Quando as membranas são mais permeáveis ao potássio do que ao cloreto, os íons potássio vão se difundir mais rapidamente do que os íons cloreto e vai ocorrer uma separação de cargas (+ e –).

Um importante princípio que sempre deve estar em mente, quando se considera o movimento de íons através de membranas, é o da neutralidade elétrica. A solução como um todo sempre contêm igual número de ânions e cátions. A existência de um potencial de membrana implica que a distribuição de cargas pela membrana é desigual; entretanto, o número real de íons desbalanceados é desprezível em termos químicos. Por exemplo, um potencial de membrana de –100 mV (milivolts) —, como aquele encontrado ao longo da membrana plasmática de muitas células vegetais —, resulta da presença de apenas um ânion extra dentre cada 100.000 presentes dentro na célula — uma diferença de concentração de somente 0,001%!

Conforme mostra a Figura 6.2, todos esses ânions extras são encontrados imediatamente adjacentes à superfície da membrana; não existe nenhum desbalanço de carga ao longo da maior parte de uma célula. Em nosso exemplo de difusão de KCl através de membrana, a neutralidade elétrica é preservada, porque, à medida que o K^+ move-se na dianteira em relação ao Cl^- na membrana, o potencial de difusão resultante retarda o movimento do K^+ e acelera o do Cl^-. Eventualmente, ambos os íons difundem-se com as mesmas taxas, mas o potencial de difusão persiste e pode ser mensurado. À medida que o sistema aproxima-se do equilíbrio e o gradiente de concentração colapsa, o potencial de difusão também colapsa.

A equação de Nernst relaciona o potencial de membrana à distribuição de um íon no equilíbrio

Uma vez que a membrana é permeável tanto ao íon K^+ quanto ao íon Cl^-, o equilíbrio no exemplo anterior não será alcançado para qualquer um dos íons, até que os gradientes de concentração decresçam a zero. Entretanto, se a membrana fosse permeável somente ao K^+, a difusão de K^+ carregaria cargas através da membrana até que o potencial desta balanceasse o gradiente de concentração. Pelo fato de a mudança no potencial exigir muito poucos íons, este balanço seria alcançado instantaneamente. O transporte estaria, então, no equilíbrio, embora o gradiente de concentração permanecesse inalterado.

Quando a distribuição de qualquer soluto através da membrana atinge o equilíbrio, o fluxo passivo, J — isto é, a quantidade de soluto cruzando uma unidade de área de membrana por unidade de tempo — é o mesmo nas duas direções — de fora para dentro e de dentro para fora:

$$J_{o \rightarrow i} = J_{i \rightarrow o}$$

Os fluxos estão relacionados a $\Delta\tilde{\mu}$ (para uma discussão sobre fluxos e $\Delta\tilde{\mu}$, ver **Capítulo 2 na Internet**); assim, no equilíbrio, os potenciais eletroquímicos serão os mesmos:

$$\tilde{\mu}_j^{\,o} = \tilde{\mu}_j^{\,i}$$

e para qualquer íon (o íon é aqui simbolizado pelo subscrito j):

$$\mu_j^* + RT \ln C_j^{\,o} + z_j F E^o = \mu_j^* + RT \ln C_j^{\,i} + z_j F E^i \qquad (6.9)$$

Rearranjando a Equação 6.9, pode-se obter a diferença em potencial elétrico entre dois compartimentos no equilíbrio ($E^i - E^o$):

$$E^i - E^o = \frac{RT}{z_j F}\left(\ln \frac{C_j^{\,o}}{C_j^{\,i}}\right)$$

A diferença de potencial elétrico é conhecida como **potencial de Nernst** (ΔE_j) para aquele íon:

$$\Delta E_j = E^i - E^o$$

e

$$\Delta E_j = \frac{RT}{z_j F}\left(\ln \frac{C_j^o}{C_j^i}\right)$$

ou

$$\Delta E_j = \frac{2{,}3RT}{z_j F}\left(\log \frac{C_j^o}{C_j^i}\right) \qquad (6.10)$$

Esta relação, conhecida como **equação de Nernst**, estabelece que, no equilíbrio, a diferença na concentração de um íon entre dois compartimentos é balanceada pela diferença de voltagem* entre os compartimentos. A equação de Nernst pode ser ainda simplificada para um cátion univalente a 25 °C:

$$\Delta E_j = 59\text{mV} \log \frac{C_j^o}{C_j^i} \qquad (6.11)$$

Observe-se que uma diferença de concentração de dez vezes corresponde a um potencial de Nernst de 59 mV (C^o/C^i=10/1; log10 = 1). Isto significa que um potencial de membrana de 59 mV manteria um gradiente de concentração de 10 vezes de um íon que é transportado por difusão passiva. Similarmente, se um gradiente de concentração de 10 vezes de um íon existisse através de uma membrana, a difusão passiva daquele íon ao longo de seu gradiente de concentração (se lhe fosse permitido alcançar o equilíbrio) resultaria em uma diferença de 59 mV pela membrana.

Todas as células vivas exibem um potencial de membrana que é devido à distribuição assimétrica de íons entre o lado de dentro e de fora da célula. Pode-se prontamente determinar esses potenciais de membrana inserindo um microeletrodo na célula e medindo a diferença de voltagem* entre o lado de dentro da célula e o meio externo onde a mesma está banhada (Figura 6.3).

A equação de Nernst pode ser usada em qualquer ocasião para determinar se um dado íon está em equilíbrio através da membrana. No entanto, uma distinção deve ser feita entre equilíbrio e estado estacionário (do inglês, *steady state*), que é a condição na qual o influxo e o efluxo de um determinado soluto são iguais e, conseqüentemente, as concentrações do íon são constantes com relação ao tempo. Estado estacionário não é a mesma coisa que equilíbrio (ver Figura 6.1); no estado estacionário, a existência de transporte ativo pela membrana impede que muitos fluxos por difusão atinjam o equilíbrio.

*N. de T. Na terminologia elétrica, *voltagem* significa diferença de potencial elétrico entre dois pontos, de forma que não é correto falar de "diferença de voltagem" e sim de diferença de potencial (= voltagem).

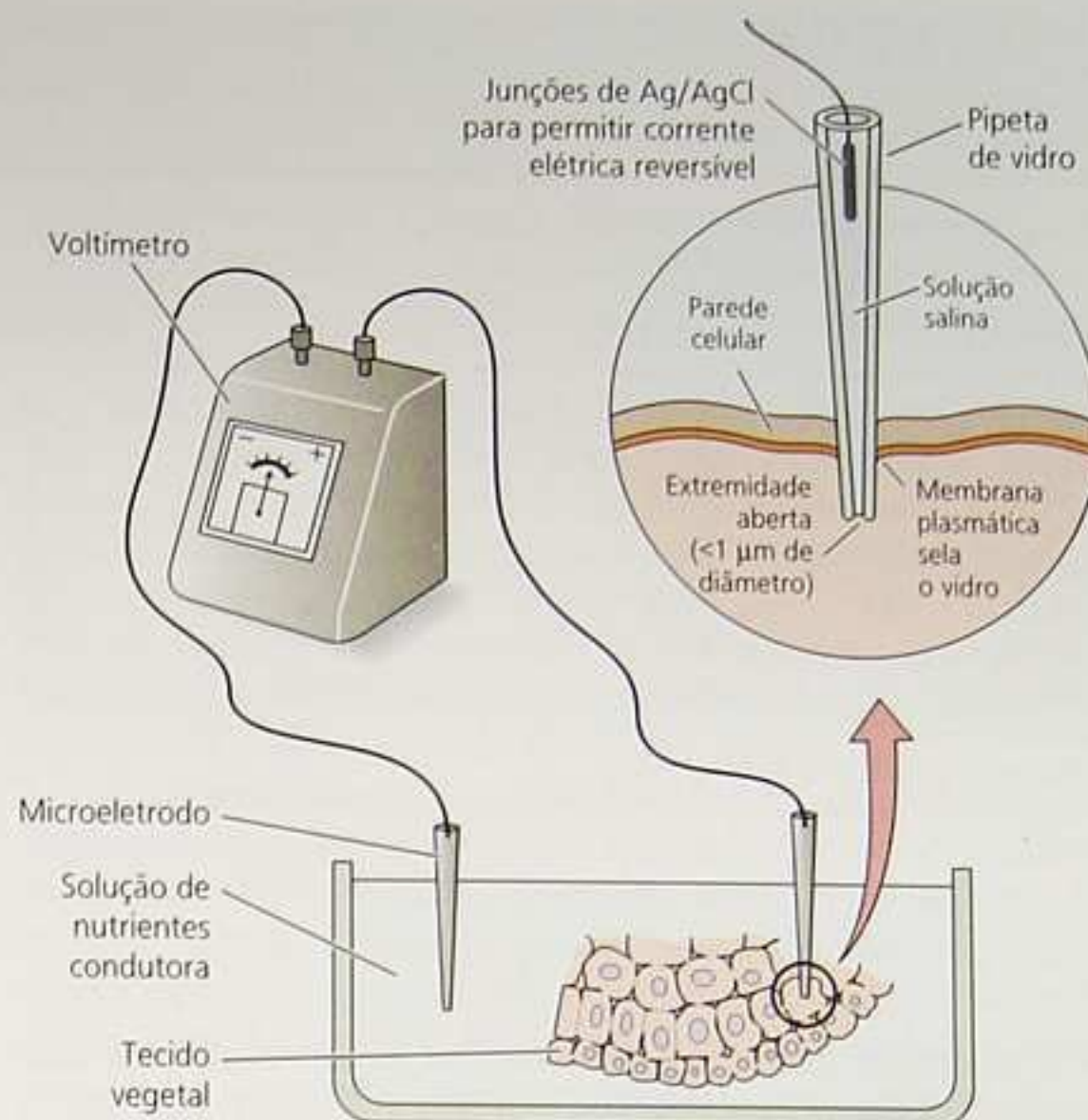



FIGURA 6.3 Diagrama de um par de microeletrodos usado para medir potenciais de membrana através de membranas celulares. Um dos eletrodos de micropipeta de vidro é inserido no compartimento celular em estudo (normalmente o vacúolo ou o citoplasma), enquanto que o outro é mantido em solução eletrolítica que serve como referência. Os microeletrodos são conectados a um voltímetro, que mede a diferença de potencial elétrico entre o compartimento celular e a solução. Potenciais de membrana típicos através das membranas celulares vão de –60 a –240 mV. O detalhe mostra como o contato elétrico do interior da célula é feito por uma extremidade aberta da micropipeta de vidro, a qual contém uma solução salina eletricamente condutiva.

A equação de Nernst pode ser usada para distinguir transporte ativo de transporte passivo

A Tabela 6.1 mostra como as concentrações iônicas experimentalmente medidas no estado estacionário para células radiculares de ervilha comparam-se com os valores previstos, calculados a partir da equação de Nernst (Higinbothan e cols., 1967). Neste exemplo, a concentração externa de cada íon na solução que banha o tecido e o potencial de membrana medido foram substituídos na equação de Nernst, além de uma concentração interna prevista haver sido calculada para aquele íon.

Observar que, de todos os íons mostrados na Tabela 6.1, apenas o K^+ está em equilíbrio ou próximo a ele. Os ânions NO_3^-, Cl^-, $H_2PO_4^-$ e SO_4^{2-} têm concentrações internas maiores do que o previsto, indicando que a absorção dos mesmos é ativa. Os cátions Na^+, Mg^{2+} e Ca^{2+} têm concentrações internas menores do que as previstas; portanto, tais íons entram na célula por difusão, a favor de seus gradientes eletroquímicos e são exportados ativamente.

O exemplo mostrado na Tabela 6.1 é uma grande simplificação: as células vegetais têm vários compartimentos internos, cada um com sua própria composição iônica. O citosol e o vacúolo são

TABELA 6.1
Comparação dos valores observados e previstos de concentração iônica em tecido radicular de ervilha

Íon	Concentração no meio externo (mmol L-1)	Concentração interna (mmol L-1)	
		Previsto	Observado
K^+	1	74	75
Na^+	1	74	8
Mg^{2+}	0,25	1340	3
Ca^{2+}	1	5360	2
NO^{3-}	2	0,0272	28
Cl^-	1	0,0136	7
$H_2PO_4^-$	1	0,0136	21
SO_4^{2-}	0,25	0,00005	19

Fonte: Higinbotham e cols., 1967.
Observação: O potencial de membrana foi medido como –110 mV.

os compartimentos mais importantes na determinação das relações iônicas das células vegetais. Em células vegetais maduras, o vacúolo central geralmente ocupa 90% ou mais do volume celular, enquanto o citosol está restrito a uma fina camada ao redor da periferia da célula.

Em decorrência de seu pequeno volume, o citosol da maioria das células de angiospermas é de difícil análise química. Por esta razão, a maior parte dos trabalhos mais antigos acerca das relações iônicas das plantas centraram-se em algumas algas verdes, como *Chara* e *Nitella*, cujas células têm vários centímetros de comprimento e podem conter um volume apreciável de citosol. A Figura 6.4 esquematiza as conclusões destes estudos e de trabalhos relacionados com plantas superiores.

- O potássio é acumulado passivamente pelo citosol e pelo vacúolo, exceto quando as concentrações extracelulares de K+ são muito baixas, sendo que neste caso ele é absorvido ativamente.
- O sódio é ativamente bombeado para fora do citosol, indo para dentro dos espaços intercelulares e do vacúolo.
- Prótons em excesso, gerados pelo metabolismo intermediário, também são ativamente expelidos do citosol. Este processo ajuda a manter o pH citosólico perto da neutralidade, enquanto o vacúolo e o meio extracelular são geralmente mais ácidos em uma ou duas unidades de pH.
- Todos os ânions são absorvidos ativamente para dentro do citosol.
- O cálcio é transportado ativamente para fora do citosol, tanto na membrana celular quanto na vacuolar, a qual é chamada de *tonoplasto* (ver Figura 6.4).

Muitos íons diferentes permeiam simultaneamente as membranas de células vivas, mas K^+, Na^+ e Cl^- têm as concentrações internas mais elevadas e as maiores permeabilidades em células vegetais. Uma versão modificada da equação de Nernst, a **equação de Goldman**, inclui todos esses três íons e, portanto, fornece um valor mais acurado para o potencial de difusão nessas células.

O potencial de difusão calculado a partir da equação de Goldman é denominado *potencial de difusão de Goldman* (para uma discussão detalhada da equação de Goldman, ver **Tópico 6.1 na Internet**).

O transporte de prótons é um determinante importante do potencial de membrana

Quando se conhecem as permeabilidades e os gradientes iônicos, a partir da equação de Goldman é possível calcular o potencial de difusão para a membrana. Na maioria das células, o K^+ tem tanto a maior concentração interna quanto a maior permeabilidade na membrana, de forma que o potencial de difusão pode aproximar E_K, o potencial de Nernst para o K^+.

Em alguns organismos ou em tecidos como os nervos, o potencial de repouso normal da célula pode se aproximar de E_K. Este não é ocaso de plantas e fungos, que podem apresentar valores de potencial de membrana medidos experimentalmente (geralmente de –200 a –100 mV) muito mais negativos do que aqueles calculados a partir da equação de Goldman, que são geralmente apenas de –80 a –50 mV. Assim, além do potencial de difusão, o potencial de membrana tem um segundo componente. A voltagem em excesso é fornecida pela H^+-ATPase eletrogênica da membrana plasmática.

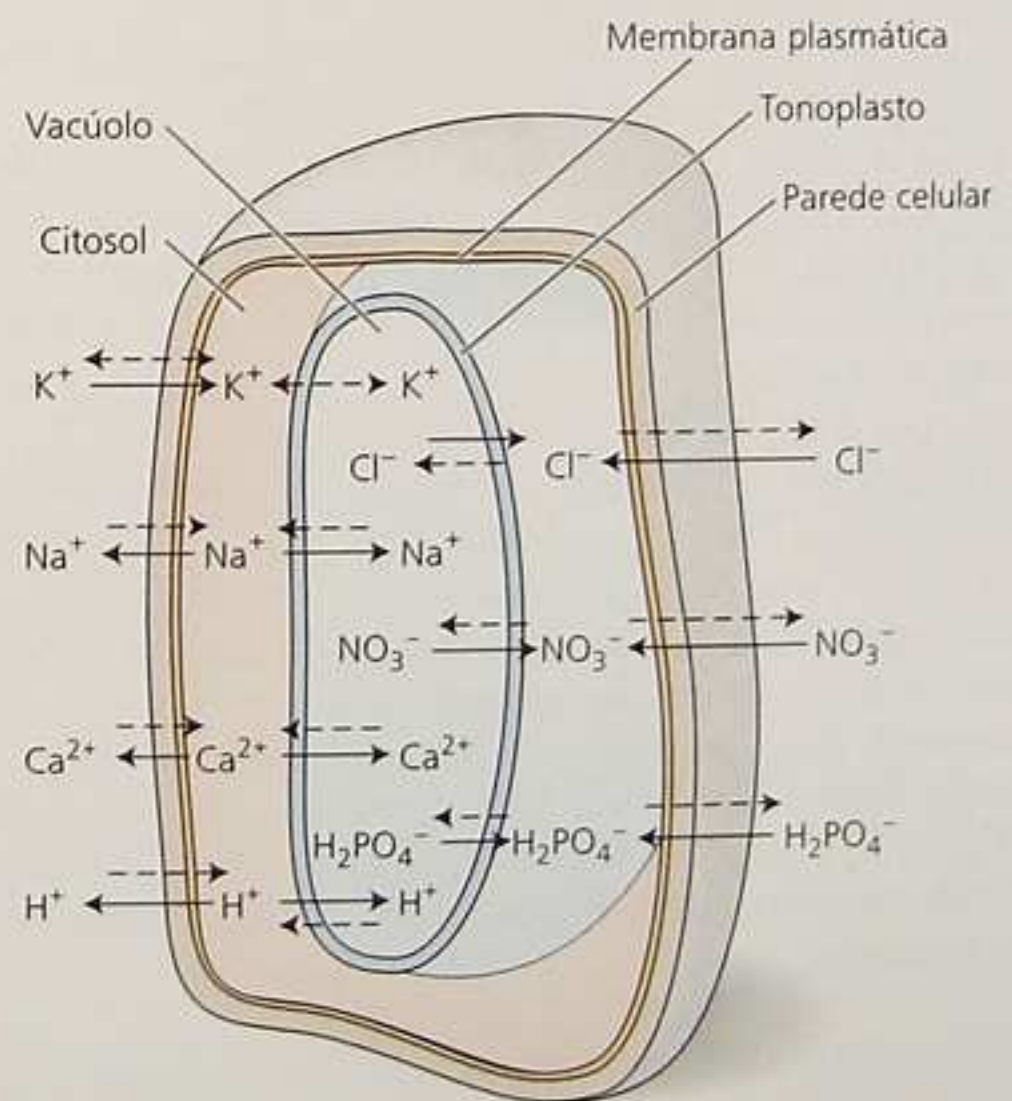
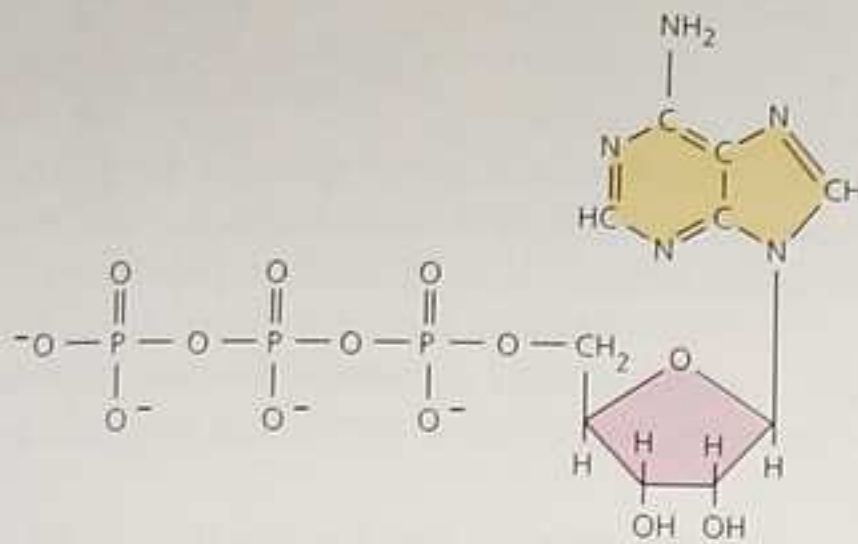



FIGURA 6.4 As concentrações iônicas no citosol e no vacúolo são controladas por processos de transporte ativo (setas tracejadas) e passivo (setas contínuas). Na maioria das células vegetais, o vacúolo ocupa até 90% do volume celular e contém a maior fração dos solutos celulares. O controle das concentrações iônicas no citosol é importante para a regulação das enzimas metabólicas. A parede celular que circunda a membrana plasmática não representa uma barreira de permeabilidade e, portanto, não é um fator no transporte de solutos.

Sempre que um íon move-se para dentro ou para fora de uma célula sem ser balanceado pelo movimento contrário de um íon de carga oposta*, uma voltagem é criada através da membrana. Qualquer mecanismo de transporte ativo que resulte no movimento de uma carga elétrica líquida tenderá a afastar o potencial de membrana do valor previsto pela equação de Goldman. Tal mecanismo de transporte é chamado de *bomba eletrogênica*, e comum em células vivas.

Adenosina-5′-trifosfato (ATP^{4-})

A energia requerida para o transporte ativo é geralmente fornecida pela hidrólise de ATP. Em plantas, pode-se estudar a dependência do potencial de membrana com relação ao ATP observando o efeito do cianeto (CN^-) no potencial de membrana (Figura 6.5). O cianeto rapidamente envenena as mitocôndrias e, por conseqüência, o ATP celular torna-se esgotado. Como a síntese de ATP é inibida, o potencial de membrana cai para o nível do potencial de difusão de Goldman, o qual, conforme discutido na seção anterior, se deve primariamente aos movimentos passivo de K^+, Cl^- e Na^+ (ver **Tópico 6.1 na Internet**).

Desta maneira, os potenciais de membrana das células vegetais têm dois componentes: um potencial de difusão e um componente resultante do transporte iônico eletrogênico (transporte que resulta na geração de um potencial de membrana) (Spanswick, 1981). Quando o cianeto inibe o transporte iônico eletrogênico, o pH do meio externo aumenta, enquanto o citosol torna-se ácido, porque os H^+ permanecem dentro da célula. Esta é evidência de que o transporte ativo de H^+ para fora da célula que é eletrogênico.

Conforme foi discutido, uma mudança no potencial de membrana causada por uma bomba eletrogênica mudará as forças propulsoras para a difusão de todos os íons que atravessam a membrana. Por exemplo, o transporte para fora de H^+ pode criar uma força propulsora para a difusão passiva de K^+ para dentro da célula. H^+ é transportado eletrogenicamente através da membrana plasmática, não somente em plantas, mas também em bactérias, algas, fungos e algumas células animais, como aquelas do epitélio do fígado.

A síntese de ATP nas mitocôndrias e nos cloroplastos também depende de uma H^+-ATPase. Nessas organelas, a proteína de transporte é algumas vezes chamada de *ATP sintase*, porque ela forma ATP, em vez de hidrolisá-lo (ver Capítulo 11). A estrutura e a função das proteínas de membranas envolvidas no transporte ativo e passivo em células vegetais serão discutidas posteriormente.

*N. de T. Na verdade, os autores referem-se ao movimento contrário de um íon de mesma carga ou ao movimento de um íon de carga oposta na mesma direção.

PROCESSOS DE TRANSPORTE EM MEMBRANAS

Membranas artificiais compostas de fosfolipídeos puros têm sido amplamente utilizadas para estudar a permeabilidade de membranas. Quando a permeabilidade de bicamadas fosfolipídicas artificiais, para íons e moléculas, é comparada com a de membranas biológicas, similaridades e diferenças importantes tornam-se evidentes (Figura 6.6).

Tanto membranas biológicas quanto artificiais têm permeabilidades similares para moléculas não-polares e muitas moléculas polares pequenas. Por outro lado, membranas biológicas são muito mais permeáveis a íons e a algumas moléculas polares grandes, como açúcares, do que as bicamadas artificiais. A razão para isto é que, ao contrário das bicamadas artificiais, as membranas biológicas contêm **proteínas de transporte** que facilitam a passagem de íons selecionados e de outras moléculas polares.

As proteínas de transporte exibem especificidade para os solutos que elas transportam, e, por isso, existe grande diversidade das mesmas nas células. O procarionte simples, *Haemophilus influenzae*, o primeiro organismo para o qual o genoma completo foi seqüenciado, tem apenas 1.743 genes e, mesmo assim, mais de 200 deles (mais do que 10% do genoma) codificam várias proteínas envolvidas no transporte de membranas. Em *Arabidopsis*, 849 genes, ou 4,8% do total, codificam proteínas envolvidas no transporte de membranas

Embora em geral uma determinada proteína de transporte seja altamente específica para os tipos e substâncias que transporta, sua especificidade não é absoluta: ela via de regra também transporta uma pequena família de substâncias relacionadas. Por exemplo, em plantas um transportador de K^+ na membrana plasmática pode transportar Rb^+ e Na^+, além do K^+, mas K^+ é geralmente preferido. Por outro lado, o transportador de K^+ é

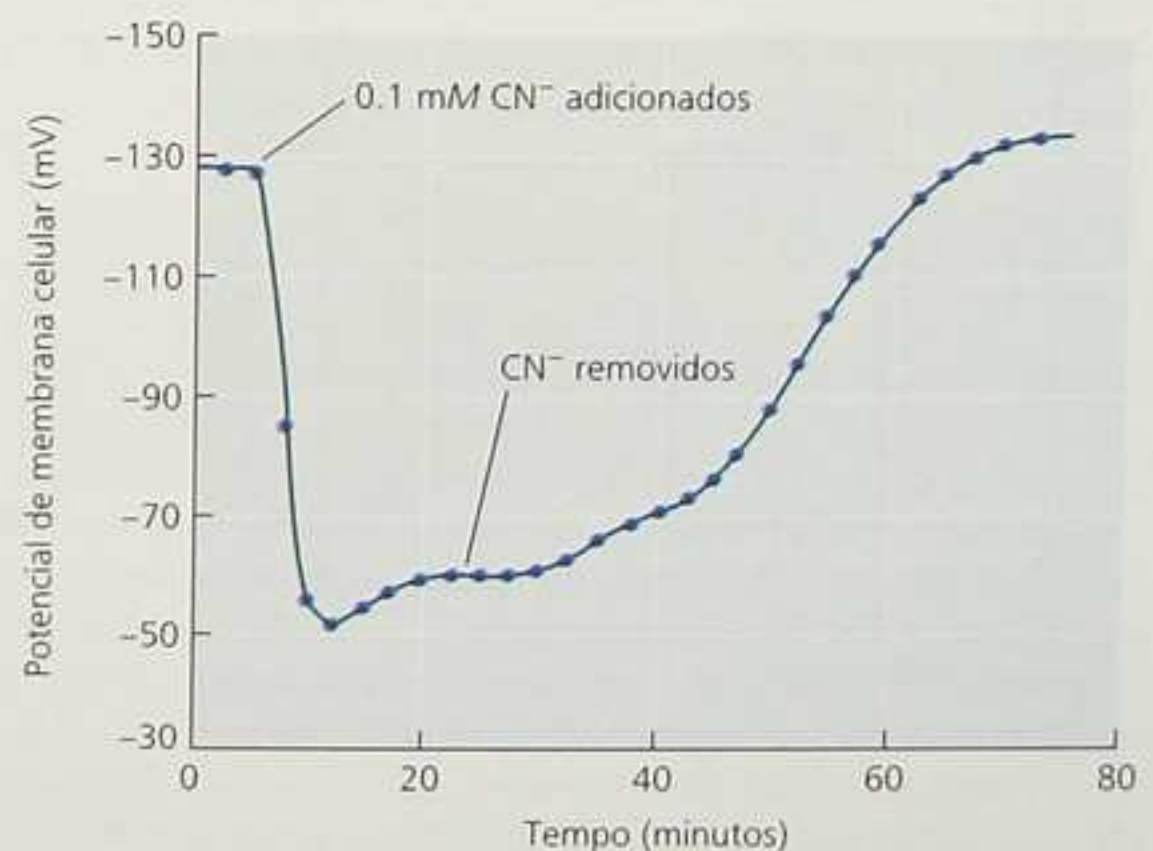



FIGURA 6.5 O potencial de membrana de uma célula de ervilha colapsa quando cianeto (CN^-) é adicionado à solução que a banha. O cianeto bloqueia a síntese de ATP nas células, envenenando as mitocôndrias. O colapso do potencial de membranas sob adição de cianeto indica que um suprimento de ATP é necessário para a manutenção do potencial. A remoção do cianeto do tecido resulta em uma lenta recuperação da produção e ATP e restauração do potencial de membrana (Higinbotham e cols., 1970).

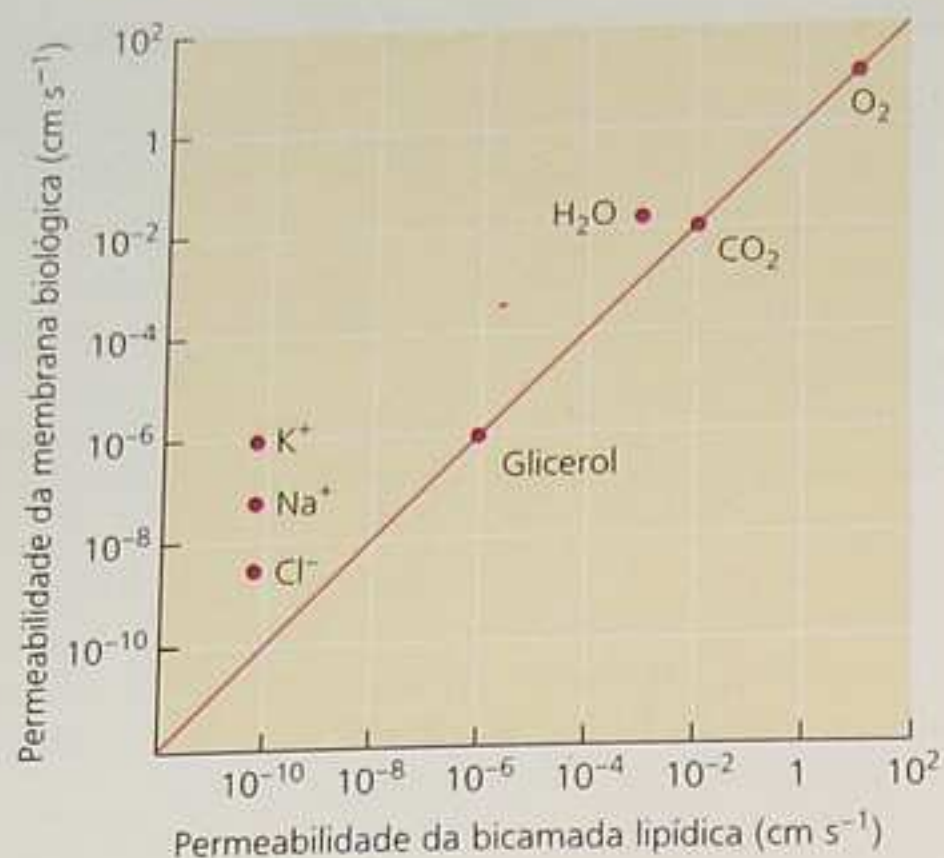



FIGURA 6.6 Valores típicos para a permeabilidade, *P*, de uma membrana biológica a várias substâncias, comparados com aqueles de uma bicamada fosfolipídica artificial. Para moléculas não-polares, como O_2 e CO_2, assim como para algumas moléculas sem carga, como glicerol, os valores de *P* são semelhantes em ambos os sistemas. Para íons e moléculas polares específicas, incluindo a água, a permeabilidade de membranas biológicas é aumentada em uma ou mais ordens de magnitude, devido à presença de proteínas de transporte. Observar a escala logarítmica.

completamente ineficaz para transportar ânions como Cl^-, ou solutos sem carga, como a sacarose. Da mesma forma, uma proteína envolvida no transporte de aminoácidos neutros pode mover glicina, alanina e valina com a mesma facilidade, mas não aceitar ácido aspártico ou lisina.

A seguir serão consideradas as estruturas, as funções e os papéis fisiológicos dos vários transportadores de membrana encontrados em células vegetais, em especial na membrana plasmática e no tonoplasto. A discussão iniciará pelo papel de certos transportadores (canais e carregadores) em promover a difusão de solutos pelas membranas. A seguir, será feita a distinção entre transportes ativos primário e secundário e analisado o papel da H^+-ATPase eletrogênica e vários transportadores tipo simporte (proteínas que transportam duas substâncias na mesma direção simultaneamente) em governar o transporte ativo secundário acoplado a prótons.

Os transportadores do tipo canal aumentam a difusão de íons e de água através das membranas

Três tipos de transportadores de membrana aumentam o movimento de solutos através das membranas: *canais, carregadores* e *bombas* (Figura 6.7). **Canais** são proteínas transmembranas que funcionam como poros seletivos, pelos quais moléculas e íons podem se difundir pelas membranas. A dimensão de um poro e a densidade de cargas de superfície no seu revestimento interno determinam sua especificidade de transporte. O transporte ao longo dos canais é sempre passivo; como a especificidade do transporte de-

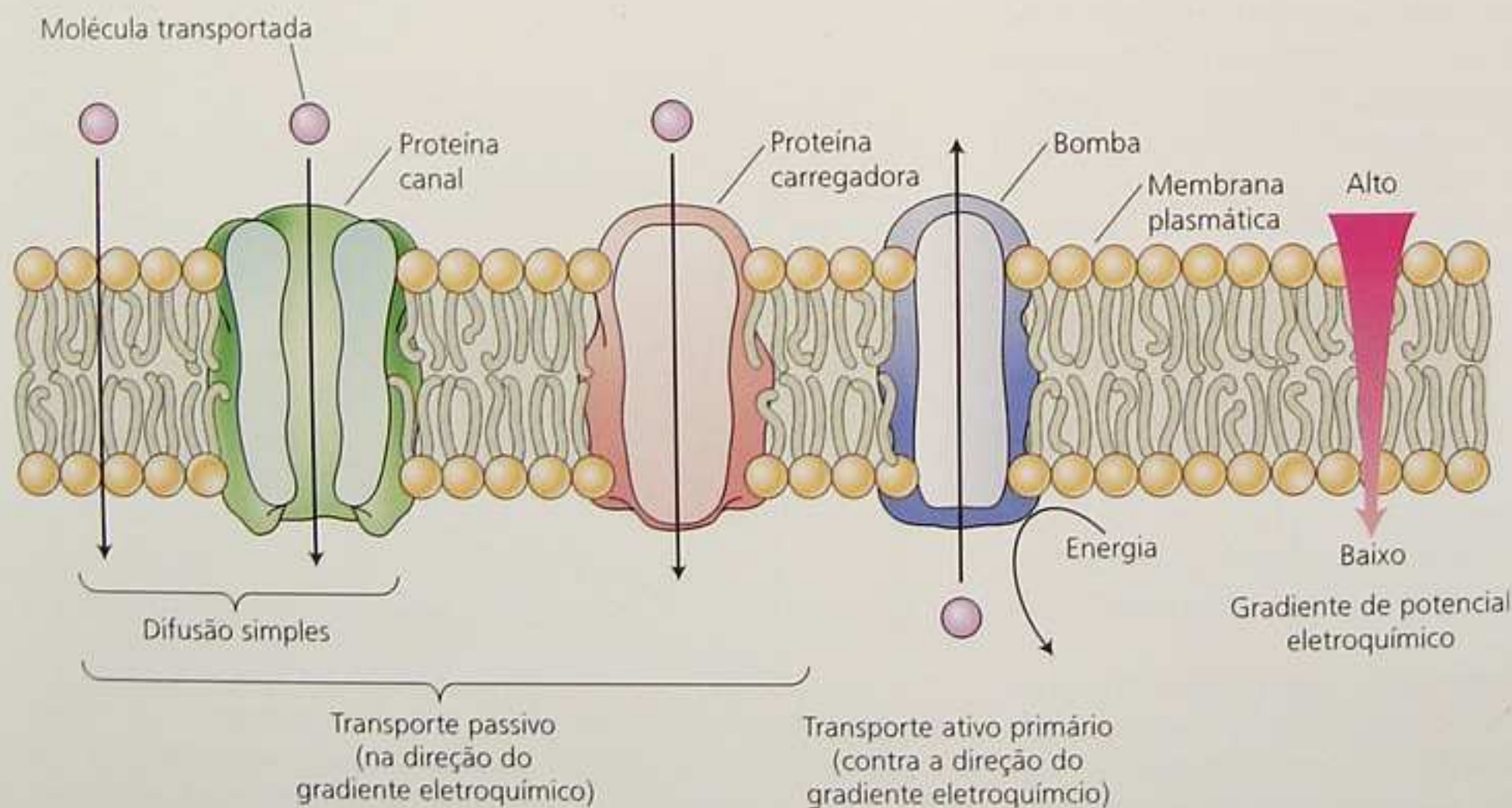



FIGURA 6.7 Três classes de proteínas de transporte em membranas: canais, carregadores e bombas. Os canais e os carregadores podem intermediar o transporte passivo de solutos pelas membranas (por difusão simples ou difusão facilitada), a favor do gradiente de potencial eletroquímico do soluto. As proteínas canais atuam como poros de membrana, e a especificidade das mesmas é determinada principalmente pelas propriedades biofísicas do canal. Proteínas carregadoras ligam a molécula transportada em uma lado da membrana e a liberam do outro lado. O transporte ativo primário é feito por bombas e emprega energia diretamente, em geral a partir da hidrólise de ATP, para bombear solutos contra seus gradientes de potencial eletroquímico.

(A)

(B)

LADO DE FORA DA CÉLULA

Membrana plasmática

Região sensora de voltagem

Região formadora do poro (domínio P ou H5)

S1 S2 S3 S4 S5 S6

N C

CITOPLASMA

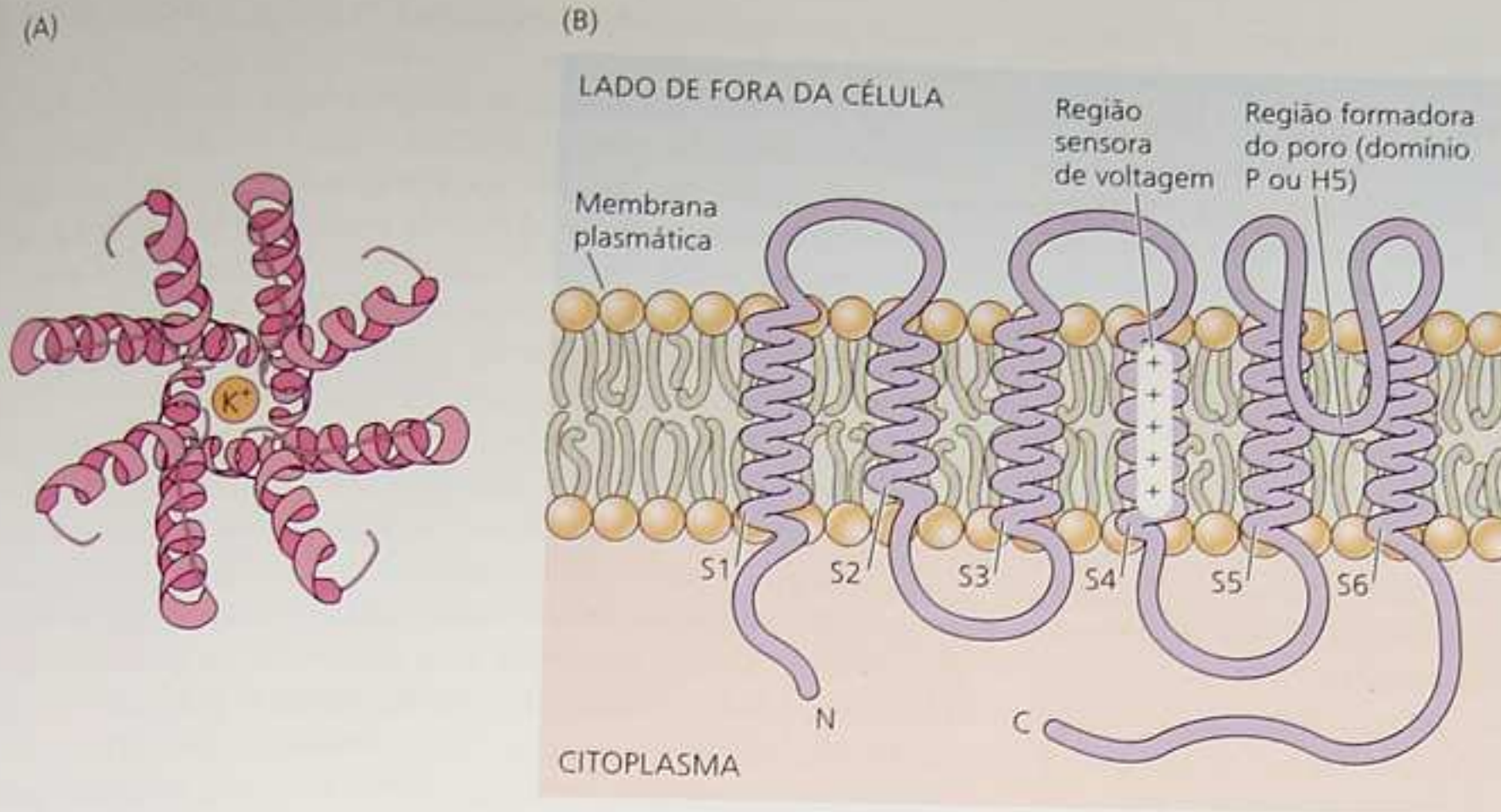



FIGURA 6.8 Modelos de canais de K^+ em plantas (A) Vista de cima de um canal, olhando pelo poro da proteína. Hélices transmembranas de quatro subunidades juntam-se em uma forma de oca invertida com o poro no centro. As regiões formadoras do poro das quatro subunidades aprofundam-se para dentro da membrana, com uma região de dedo de seletividade de K^+ formada na parte de fora (próxima) do poro (mais detalhes sobre a estrutura deste canal podem ser encontrados no **Ensaio 6.1 na Internet**). (B) Vista lateral do canal retificador de influxo de K^+, mostrando a cadeia polipeptídica de uma subunidade, com seis hélices transmembranas. A quarta hélice contém aminoácidos carregados positivamente e atua com um sensor de voltagem. A região formadora do poro é uma alça entre as hélice 5 e 6. (A segundo Leng e cols., 2002; B segundo Buchanan e cols., 2000).

pende do tamanho do poro e da carga elétrica mais do que da ligação seletiva, o transporte em canais limita-se principalmente a íons e à água (Figura 6.8).

O transporte por um canal pode ou não envolver a ligação transitória do soluto à proteína canal. De qualquer forma, desde que o canal esteja aberto, os solutos que podem penetrar o poro difundem-se de modo extremamente rápido: cerca de 10^8 íons por segundo através de cada proteína canal. Os canais não estão abertos todo o tempo: proteínas-canal têm estruturas denominadas **portões** que abrem e fecham o poro em reposta a sinais externos (ver Figura 6.8B). Sinais que podem abrir ou fechar canais incluem mudanças de voltagem, ligação hormonal ou luz. Por exemplo, canais com portões controlados por voltagem abrem ou fecham em resposta a mudanças no potencial de membrana.

Os canais iônicos individuais podem ser estudados em detalhe pela técnica eletrofisiológica de *patch clamp* (ver **Tópico 6.2 na Internet**), a qual pode detectar a corrente elétrica carregada por íons que se difundem por um único canal. Estudos com *patch clamp* revelam que, para um determinado íon como potássio, uma determinada membrana tem uma variedade de canais diferentes, os quais podem abrir sob diferentes faixas de voltagem ou em resposta a diferentes sinais, que podem incluir concentrações de K^+ e Ca^{2+}, pH, proteínas quinases e fosfatases, e assim por diante. Tal especificidade permite que o transporte de cada íon seja finamente sintonizado às condições reinantes. Assim, a permeabilidade iônica de uma membrana é uma variável dependente da mistura de canais iônicos que estão abertos em um determinado tempo.

Conforme foi visto no experimento da Tabela 6.1, a distribuição da maioria dos íons não se aproxima do equilíbrio através da membrana. Canais aniônicos sempre funcionarão no sentido de permitir que os ânions difundam-se para fora da célula, enquanto outros mecanismos são necessários para a absorção de ânions. Da mesma forma, os canais de cálcio podem funcionar somente na direção de liberação de cálcio para dentro do citosol, devendo o cálcio ser expelido por transporte ativo. A exceção é o potássio, que pode se difundir tanto para dentro quanto para fora, dependendo se o potencial de membrana é mais negativo ou mais positivo do que E_K, o potencial de equilíbrio do potássio.

Os canais de potássio que só abrem a potenciais mais negativos são especializados na difusão de K^+ para dentro e são conhecidos como canais **retificadores de entrada** de K^+ ou simplesmente canais **de entrada** de K^+. Por outro lado, canais de K^+ que se abrem somente a potenciais mais positivos são canais **retificadores de saída** de K^+ ou **de saída** de K^+ (ver **Ensaio 6.1 na Internet**). Enquanto os canais de entrada de K^+ funcionam para acumular K^+ do ambiente ou na abertura de estômatos, vários canais de saída de K^+ funcionam no fechamento estomático, na liberação de K^+ para o xilema ou na regulação do potencial de membrana.

Carregadores ligam e transportam substâncias específicas

Ao contrário dos canais, as proteínas carregadoras não têm poros que se estendam completamente pela membrana. No transporte mediado por um carregador, a substância sendo transporta-

da é inicialmente ligada a um sítio específico na proteína carregadora. Essa necessidade de ligação permite aos carregadores serem altamente seletivos para um substrato particular a ser transportado. Portanto, os carregadores especializam-se no transporte de metabólitos orgânicos específicos. A ligação gera uma mudança na conformação da proteína, a qual expõe a substância à solução no outro lado da membrana. O transporte completa-se quando a substância dissocia-se do sítio de ligação do carregador.

Em decorrência da necessidade de uma mudança na conformação da proteína para o transporte de moléculas ou íons individuais, a taxa de transporte por um carregador é várias ordens de grandeza mais lenta do que através de um canal. Tipicamente, os carregadores podem transportar de 100 a 1.000 íons ou moléculas por segundo, o que é cerca de 10^6 vezes mais lento do que o transporte pelo canal. A ligação e a liberação de uma molécula em um sítio específico de uma proteína, que ocorrem no transporte mediado por carregadores, são similares à ligação e à liberação de moléculas de uma enzima em uma reação enzimática. Conforme será discutido mais tarde neste capítulo, a cinética enzimática tem sido usada para caracterizar proteínas carregadoras de transporte (para um discussão detalhada da cinética, ver **Capítulo 2 na Internet**).

O transporte mediado por carregadores (ao contrário do transporte por canais) pode ser passivo ou ativo e transportar uma gama maior de substratos possíveis. O transporte passivo em um carregador algumas vezes é chamado de **difusão facilitada**, embora lembre difusão somente pelo fato de que ele transporta substâncias a favor de seus gradientes eletroquímicos, sem um acréscimo adicional de energia (este termo pode parecer mais apropriado quando aplicado ao transporte pelos canais, mas historicamente ele não tem sido assim utilizado).

O transporte ativo primário está diretamente acoplado à energia metabólica ou luminosa

Para realizar transporte ativo, um carregador precisa acoplar o transporte do soluto contra o gradiente com outro evento que libere energia, de modo que a mudança global na energia livre seja negativa. O **transporte ativo primário** é diretamente acoplado a uma fonte energia diferente de $\Delta\tilde{\mu}_j$, como a hidrólise de ATP, uma reação de oxidação-redução (a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias e cloroplastos), ou a absorção de luz pela proteína carregadora (em halobactéria, bacteriorodopsina).

As proteínas de membrana que catalisam o transporte ativo primário são chamadas de **bombas** (ver Figura 6.7), as quais, em sua maioria, transportam íons, como H^+ ou Ca^{2+}. Entretanto, conforme será visto mais adiante neste capítulo, as bombas que pertencem à família de transportadores do tipo "cassetes ligadores de ATP" podem transportar grandes moléculas orgânicas.

As bombas iônicas podem ser ainda caracterizadas como eletrogênicas ou eletroneutras. Em geral, o **transporte eletrogênico** refere-se ao transporte de íons envolvendo o movimento líquido de cargas pela membrana. Por outro lado, o **transporte eletroneutro,** como o próprio nome sugere, não envolve nenhum movimento líquido de cargas. Por exemplo a Na^+/K^+-ATPase de células animais bombeia três íons Na^+ para fora para cada dois íons K^+ bombeados para dentro, resultando em um movimento líquido para fora de uma carga positiva. A Na^+/K^+-ATPase é, portanto, uma bomba iônica eletrogênica. Em comparação, a H^+/K^+-ATPase da mucosa gástrica animal bombeia um H^+ para fora da célula para cada K^+ que entra, de forma que não há nenhum movimento líquido de cargas através da membrana. Portanto, a H^+/K^+-ATPase é uma bomba eletroneutra.

Na membrana plasmática de plantas, fungos e bactérias, assim como nos tonoplastos vegetais e outras endomembranas vegetais e animais, o H^+ é o principal íon que é bombeado eletrogenicamente através da membrana. A **H^+-ATPase da membrana plasmática** gera o gradiente de potenciais eletroquímicos de H^+ através das membranas plasmáticas, enquanto que a **H^+-ATPase vacuolar** e a **H^+-pirofosfatase (H^+-PPase)** bombeia prótons eletrogenicamente para dentro do lume do vacúolo e para a cisterna do Golgi.

Nas membranas plasmáticas das plantas, as bombas principais são as de H^+ e Ca^{2+}, e a direção do bombeamento é para fora. Portanto, um outro mecanismo é necessário para governar a absorção ativa da maioria dos nutrientes minerais. A outra forma importante pela qual os solutos podem ser ativamente transportados através das membranas, contra seus gradientes de potenciais eletroquímicos, é acoplando o transporte contra o gradiente de um soluto com o transporte a favor do gradiente de outro. Este tipo de co-transporte mediado por carregadores é denominado **transporte ativo secundário** e é governado indiretamente por bombas.

O transporte ativo secundário utiliza a energia armazenada em gradientes de potencial eletroquímico

Os prótons são excluídos do citosol por H^+-ATPases eletrogênicas que operam na membrana plasmática e na membrana do vacúolo. Conseqüentemente, um potencial de membrana e um gradiente de pH são criados às custas da hidrólise de ATP. Esse gradiente de potencial eletroquímico para H^+, $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$,ou (quando expresso em outras unidades) a **força-motriz de prótons (do inglês** PMF, *proton motive force*), ou Δp, representa energia livre armazenada na forma de um gradiente de H^+ (ver **Tópico 6.3 na Internet**).

A força motriz de prótons gerada pelo transporte eletrogênico de H^+ é usada no transporte ativo secundário para governar o transporte de muitas outras substâncias contra seus gradientes de potencial eletroquímico. A Figura 6.9 mostra como o transporte secundário pode envolver a ligação de um substrato (S) e de um íon (normalmente H^+) a uma proteína carregadora e uma mudança na conformação desta proteína.

Existem dois tipos de transporte secundário: simporte e antiporte. O exemplo mostrado na Figura 6.9 é denominado **simporte** (e a proteína envolvida é chamada de *transportador tipo simporte*), porque as duas substâncias estão se movendo na mesma direção através da membrana (ver também Figura 6.10A). **Antiporte** (facilitado por uma proteína denominada *transportador tipo antiporte*) refere-se ao transporte acoplado, no qual o movimento a favor do gradiente de prótons impulsiona o transporte ativo de um soluto na direção oposta (Figura 6.10B).

Em ambos os tipos de transporte secundário, o íon ou soluto sendo transportado simultaneamente com os prótons está se movendo contra seu gradiente de potencial eletroquímico, de forma que se trata de transporte ativo. Entretanto, a energia que governa este transporte é proporcionada pela força-motriz de prótons, em vez de diretamente pela hidrólise de ATP.

Tipicamente, o transporte por meio de uma membrana biológica é energizado por um sistema de transporte ativo primário acoplado à hidrólise de ATP. O transporte de um íon — por exemplo, H^+ — gera um gradiente iônico e um potencial eletroquímico. Muitos outros íons e substratos orgânicos podem, então, ser transportados por uma variedade de proteínas de transporte ativo

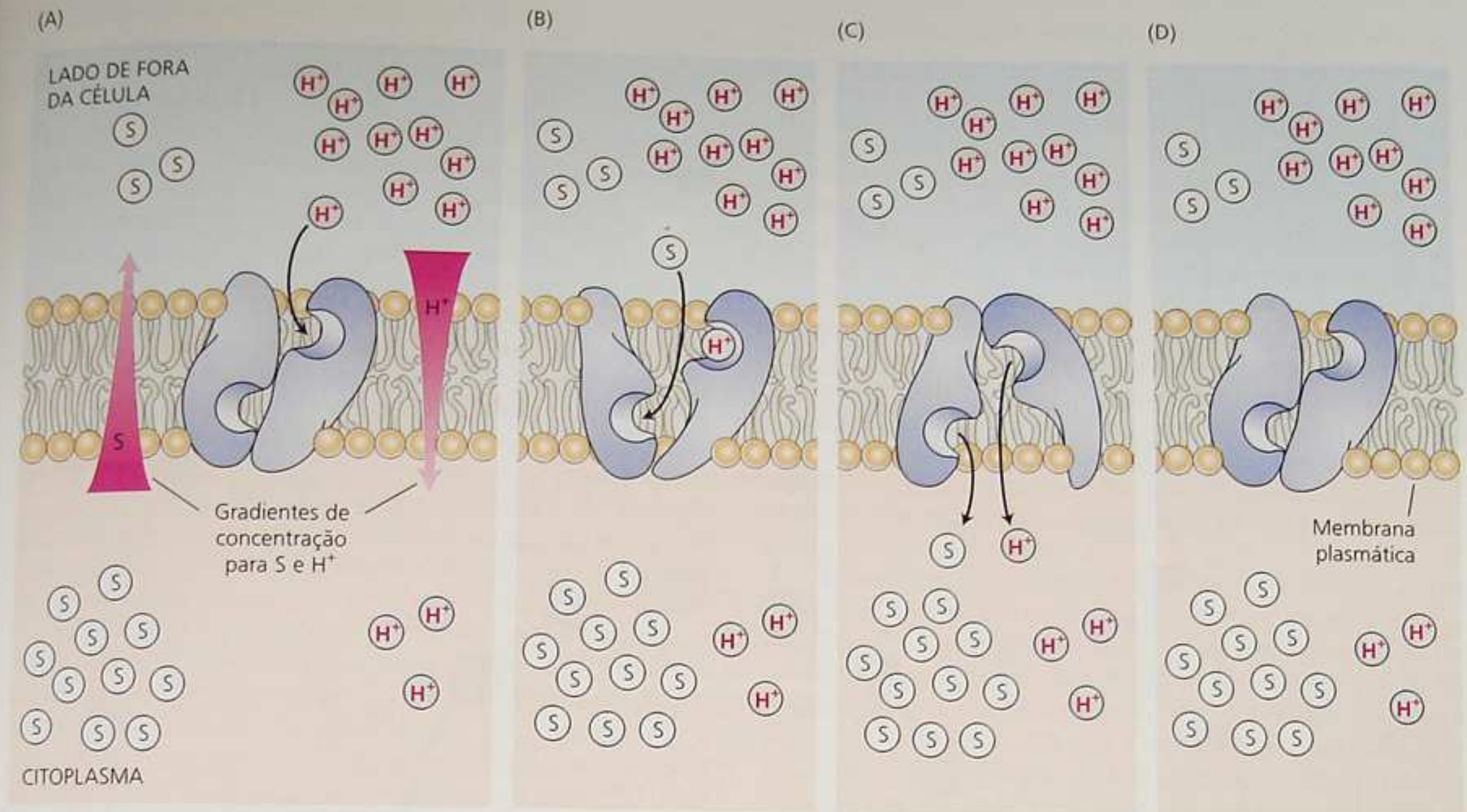



FIGURA 6.9 Modelo hipotético para o transporte ativo secundário. A energia que governa o processo foi armazenada em um $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ (simbolizado pela seta vermelha à direita em A) e está sendo usada para absorver um substrato (S) contra seu gradiente de concentração (seta vermelha à esquerda). (A) Na conformação inicial, os sítios de ligação na proteína estão expostos ao ambiente externo e podem ligar um próton. (B) Esta ligação resulta em uma mudança na conformação que permite a uma molécula de S ser ligada (C) A ligação de S provoca uma outra mudança na conformação que expõe os sítios de ligação e seus substratos ao interior da célula. (D) A liberação de um próton e de uma molécula de S para o interior celular restabelece conformação original do carregador e permite que um novo ciclo de bombeamento inicie.

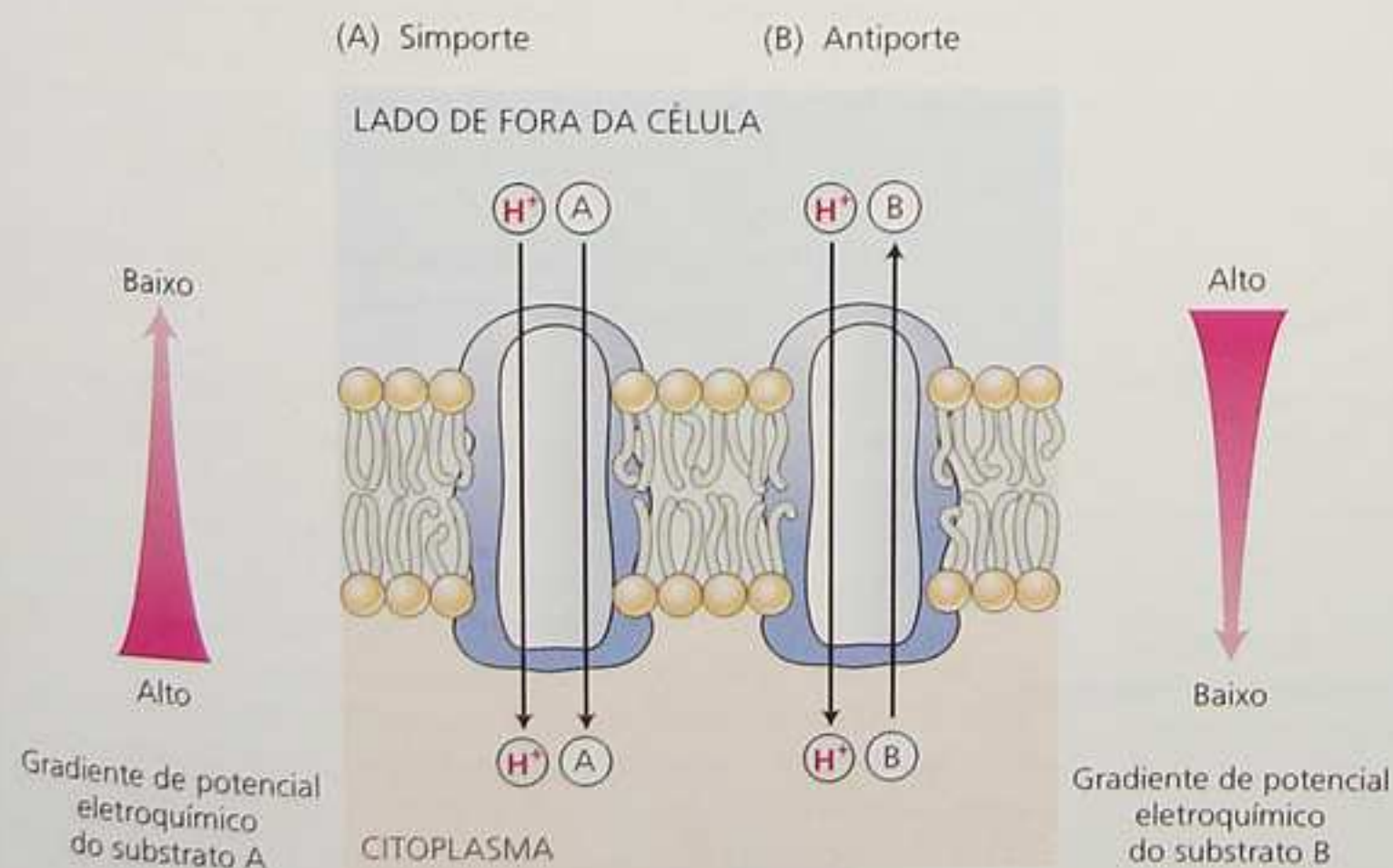



FIGURA 6.10 Dois exemplos de transporte ativo secundário acoplados a um gradiente de prótons primário. (A) Em um simporte, a energia dissipada por um próton que se move de volta para dentro da célula é acoplada à absorção de uma molécula de um substrato (p. ex., um açúcar) para dentro da célula. (B) Em um antiporte, a energia dissipada por um próton que se move de volta para dentro da célula é acoplada ao transporte ativo de um substrato (p. ex., um íon sódio) para fora da célula. Em ambos os casos, o substrato sendo considerado está se movendo contra seu gradiente de potencial eletroquímico. Tanto substratos neutros quanto com carga podem ser transportados por tais processos de transporte ativo secundário.

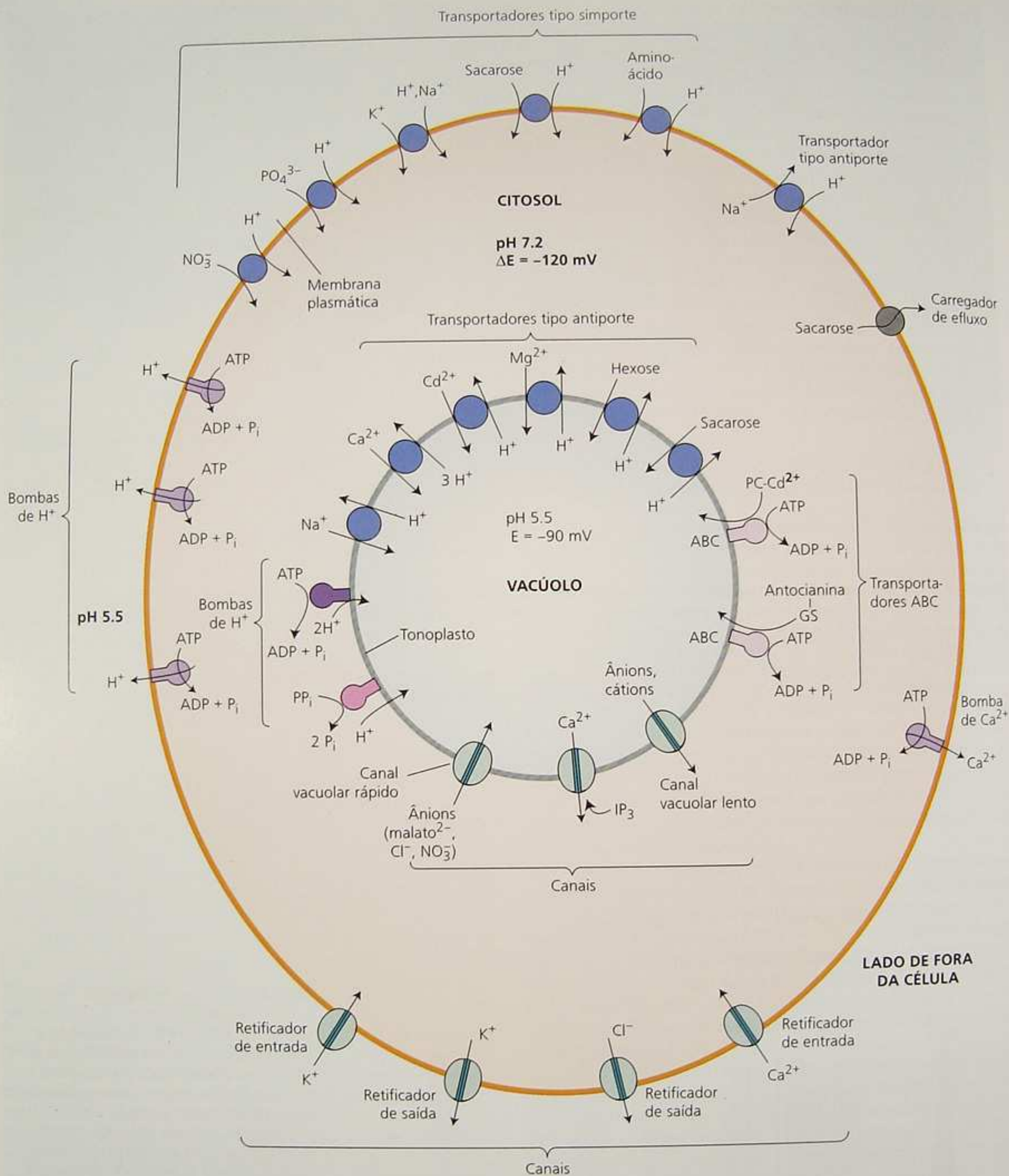



FIGURA 6.11 Panorama geral dos vários processos de transporte na membrana plasmática e tonoplasto de células vegetais.

secundário, que energizam o transporte de seus respectivos substratos, carregando simultaneamente um ou dois íons H^+ a favor de seus gradientes de energia. Assim, íons H^+ circulam através da membrana, para fora por intermédio das proteínas de transporte ativo primário e de volta para dentro da célula através de proteínas de transporte secundário. Em plantas e fungos, açúcares e aminoácidos são absorvidos por simporte com prótons.

A maioria dos gradientes iônicos gerados através das membranas de plantas superiores é gerada e mantida por gradientes de potencial eletroquímico de H^+ (Tazawa e cols., 1987). Por sua vez, esses gradientes de H^+ são gerados por bombas eletrogênicas de prótons. As evidências sugerem que em plantas o Na^+ é transportado para fora da célula por um transportador Na^+-H^+ tipo antiporte e que Cl^-, $NO3^-$, $H_2PO_4^-$, sacarose, aminoácidos e outras substâncias entram na célula via transportadores tipo simporte de prótons específicos.

E o K^+? A concentrações externas muito baixas, o K^+ pode ser absorvido por proteínas transportadoras tipo simporte ativas, mas a concentrações maiores ele pode entrar na célula por difusão através dos canais específicos para K^+. Entretanto, mesmo o influxo através dos canais é impulsionado pela H^+-ATPase, no sentido que a difusão do K^+ é governada pelo potencial de membrana, o qual é mantido a um valor mais negativo do que o potencial de equilíbrio para K^+, pela ação da bomba eletrogênica de H^+. Por outro lado, o efluxo de K^+ exige que o potencial de membrana seja mantido a um valor mais positivo do que E_K, o que pode ser alcançado se for permitido o efluxo de Cl^- através dos canais de Cl^-. Vários processos de transporte representativos, localizados na membrana plasmática e no tonoplasto, estão ilustrados na Figura 6.11.

PROTEÍNAS DE TRANSPORTE EM MEMBRANAS

Foi visto nas seções anteriores que algumas proteínas transmembranas operam como canais para a difusão controlada de íons. Outras proteínas de membrana trabalham como carregadoras para outras substâncias (principalmente moléculas e íons). O transporte ativo utiliza proteínas do tipo carregadoras, as quais são diretamente energizadas pela hidrólise de ATP ou indiretamente como transportadores tipos simporte e antiporte. Estes últimos sistemas utilizam a energia do gradiente de íons (normalmente um gradiente de H^+) para governar o transporte contra o gradiente de outro íon ou molécula. A seguir serão examinadas com mais detalhes as propriedades moleculares, as localizações celulares e as manipulações genéticas de algumas dessas proteínas de transporte.

Análises cinéticas podem elucidar mecanismos de transporte

Até agora, foi descrito o transporte celular em termos energéticos. Entretanto, o transporte celular também pode ser estudado pelo uso da cinética enzimática, pois ele envolve a ligação e a dissociação de moléculas a sítios ativos nas proteínas de transporte. Uma vantagem da abordagem cinética é que ela fornece novas idéias a respeito da regulação do transporte.

Em experimentos de cinética, são medidos os efeitos das concentrações externas de íons (ou outros solutos) nas taxas de transporte. As características cinéticas das taxas de transporte podem, então, ser usadas para distinguir diferentes transportadores. A taxa máxima (V_{max}) do transporte mediado por carregadores e, freqüentemente, também do transporte por canais não pode ser excedida, independente da concentração de substrato (Figura 6.12). V_{max} é alcançada quando o sítio de ligação do substrato no carregador está sempre ocupado. A concentração do carregador, e não a do soluto, torna-se limitante da taxa de transporte. Assim, V_{max} é uma medida do número de moléculas da proteína carregadora específica que estão funcionando na membrana.

A constante K_m (que é numericamente igual à concentração de soluto que gera metade da taxa máxima de transporte) tende a refletir as propriedade do sítio de ligação em particular (para uma discussão detalhada de K_m e V_{max}, ver **Capítulo 2 na Internet**). Baixos valores de K_m indicam alta afinidade do local de transporte pela substância transportada. Tais valores normalmente implicam a operação de um sistema de carregadores. Altos valores de K_m indicam uma menor afinidade do sítio de transporte pelo soluto. A afinidade é muitas vezes tão baixa que, na prática, V_{max} nunca é alcançada. Em tais casos, a cinética sozinha não pode distinguir entre carregadores e canais.

Normalmente, o transporte mostra componentes tanto de alta quanto de baixa afinidade, quando uma vasta gama de concentrações de soluto é estudada. A Figura 6.13 mostra a absorção de sacarose por protoplastos de cotilédones de soja em função da concentração externa de sacarose (Lin e cols., 1984). A absorção aumenta significativamente com a concentração e começa a saturar a cerca de 10 m*M*. Em concentrações superiores a 10 m*M*, a absorção torna-se linear e não-saturável. A inibição da síntese de ATP com venenos metabólicos bloqueia o componente saturável, mas não o linear. A interpretação é que a absorção de sacarose a baixas concentrações constitui-se em um processo ativo mediado por carregador (simporte sacarose-H+). A concentrações maiores, a sacarose entra na célula por difusão, a favor de seu gradiente de concentração e é, portanto, insensível aos venenos metabólicos.

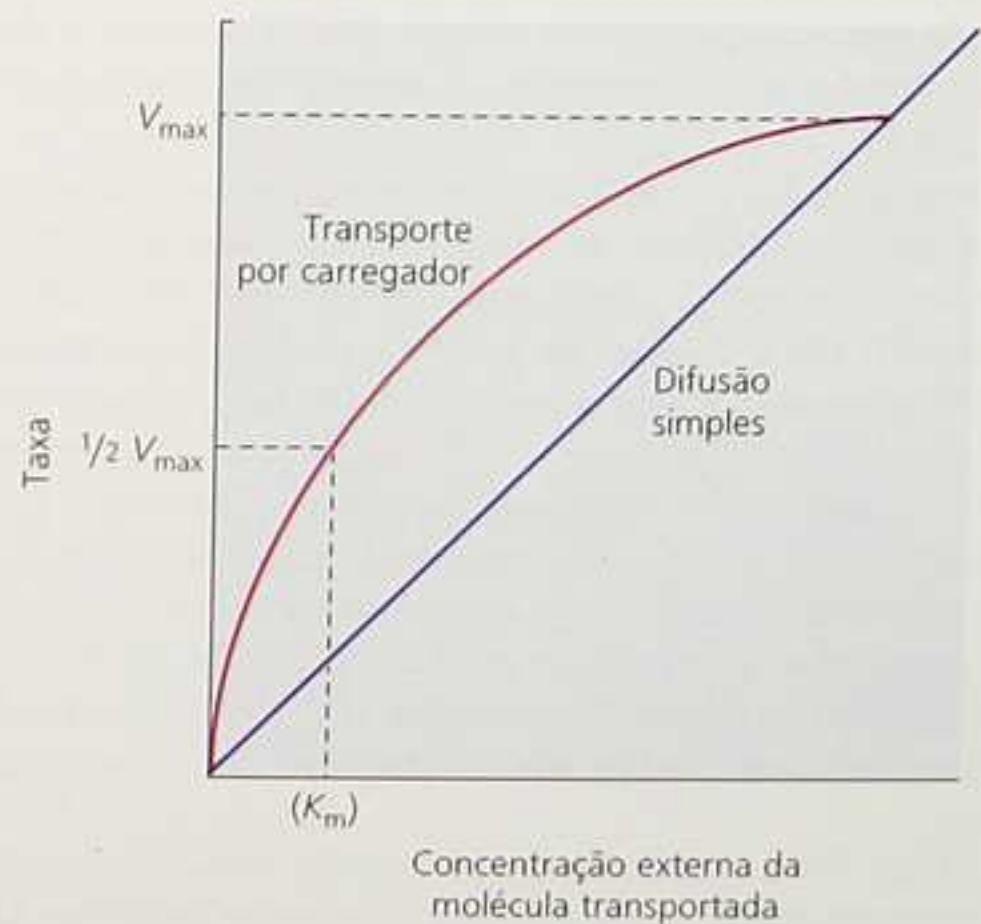



FIGURA 6.12 O transporte por carregador normalmente apresenta cinética de saturação (V_{max}) (ver **Capítulo 2 na Internet**), devido à saturação do sítio de ligação. Idealmente, a difusão através dos canais é diretamente proporcional à concentração do soluto transportado, ou, para um íon, à diferença de potencial eletroquímico através da membrana.

FIGURA 6.13 As propriedades de transporte de um soluto podem mudar a diferentes concentrações de soluto. Por exemplo, a baixas concentrações (1 a 10m*M*), a taxa de absorção de sacarose por células de soja mostra um cinética de saturação típica de carregadores. Prevê-se que uma curva ajustada a esses dados aproxime-se de uma taxa máxima (V_{max}) de 57 nmol por 10^6 células por hora. Por outro lado, em concentrações maiores de sacarose, a taxa de absorção continua a aumentar linearmente, ao longo de uma ampla faixa de concentrações, sugerindo a existência de outros transportadores de sacarose, que podem ser carregadores com afinidade muito baixa pelo substrato (Lin e cols., 1984).

Entretanto, informação adicional é necessária para investigar se o componente não-saturável representa a absorção por um carregador com baixa afinidade ou por um canal (o transporte por carregador é mais provável no caso de um soluto molecular como a sacarose).

Os genes para muitos transportadores foram clonados

A identificação, o isolamento e a clonagem de genes de transportadores têm muito auxiliado na elucidação das propriedades moleculares das proteínas de transporte. O transporte de nitrato é um exemplo interessante, não apenas devido à sua importância nutricional, mas também por sua complexidade. A análise cinética mostra que o transporte de nitrato, como o transporte de sacarose apresentado na Figura 6.13, tem componentes tanto de alta afinidade (baixo K_m) quanto de baixa afinidade (alto K_m). Ao contrário da sacarose, o nitrato é negativamente carregado, e tal carga elétrica impõe uma necessidade de energia para o transporte do íon nitrato em todas as concentrações. A energia é fornecida por simporte com H^+.

O transporte de nitrato é também fortemente regulado de acordo com a disponibilidade de nitrato. As enzimas necessárias ao transporte de nitrato, assim como à assimilação do nitrato (ver Capítulo 12) são induzidas na presença de nitrato no ambiente, podendo a absorção também ser suprimida caso o nitrato se acumule nas células.

Os mutantes para transporte ou redução do nitrato podem ser selecionados ao longo do crescimento na presença de clorato (ClO_3^-). O clorato é um análogo do nitrato que é absorvido e reduzido, em plantas selvagens, ao produto tóxico clorito. Se plantas resistentes ao clorato são selecionadas, elas provavelmente mostrarão mutações que bloqueiam o transporte ou a redução do nitrato.

Várias dessas mutações foram identificadas em *Arabidopsis*, uma pequena crucífera que é ideal para estudos genéticos. O primeiro gene de transporte identificado desta maneira codifica um transportador nitrato-próton tipo simporte induzível de baixa afinidade. À medida que mais genes para o transporte de nitrato foram identificados e caracterizados, o cenário tornou-se mais complexo. Cada componente do transporte pode envolver mais do que um produto gênico e pelo menos um gene codifica um carregador de afinidade dual, que contribui tanto para o transporte de alta quanto de baixa afinidade (Chrispeels e cols., 1999).

O cenário que emerge acerca dos genes de transporte em plantas mostra que uma família de genes, em vez de um gene individual, existe no genoma da planta para cada função de transporte. Dentro de uma família de genes, variações nas características de transporte, como K_m, no modo de regulação e na expressão diferencial de tecidos conferem às plantas uma notável plasticidade para se aclimatarem a uma ampla faixa de condições ambientais.

A identificação de regiões de similaridade de seqüências entre genes de transporte das plantas e genes de transporte de outros organismos, como fermentos, permitiu a clonagem de genes de transporte em plantas (Kochian, 2000). Em alguns casos, foi possível identificar o gene depois da purificação da proteína de transporte, mas geralmente a similaridade de seqüência é limitada, sendo que proteínas de transporte individuais representam uma fração muito pequena da proteína total. Uma outra forma de identificar genes de transporte é pesquisar bibliotecas de cDNA (DNA complementar) de plantas na busca de genes que complementem (i. é, que compensem) deficiências de transporte em fermentos. Muitos fermentos mutantes em transporte são conhecidos e foram usados para identificar genes vegetais correspondentes por complementação.

No caso de genes para canais iônicos, os pesquisadores estudaram o comportamento de proteínas de canal expressando os genes em oócitos dos sapos *Xenopus*, os quais, devido ao grande tamanho, são convenientes em estudos eletrofisiológicos. Os genes, tanto para canais retificadores de entrada quanto de saída de K^+, foram, assim, clonados e estudados. Dos genes de canais de entrada de K^+ identificados até o momento, um é fortemente expresso em células-guarda, outro em raízes e um terceiro em folhas. Tais canais são tidos como responsáveis pela absorção de baixa afinidade de K^+ por células vegetais.

Um canal de saída de K^+ responsável pelo fluxo de K^+ das células radiculares do estelo para os vasos mortos do xilema foram clonados, além de identificados vários genes para carregadores de K^+ de alta afinidade. Pesquisas adicionais são necessárias para determinar com que extensão eles contribuem para a absorção de K^+ e como obtêm energia (ver **Tópico 6.4 na Internet**). Genes para transportadores vacuolares H^+-Ca^{2+} tipo antiporte e genes para transportadores de próton tipo simporte de vários aminoácidos e açúcares também foram identificados por meio de várias técnicas genéticas (Hirshi e cols., 1996; Tanner e Caspari, 1996; Kuehn e cols., 1999).

Genes para canais específicos de água foram identificados

Aquaporinas são uma classe de proteínas relativamente abundantes em membranas vegetais (ver Capítulo 3). As aquaporinas não revelam nenhuma corrente de íons quando expressas em oócitos, mas, quando a osmolaridade do meio externo é reduzida, a expressão dessas proteínas resulta em intumescimento e ruptura dos oócitos. O rompimento advém do rápido influxo de água através da membrana plasmática do oócito, o qual normalmente tem uma permeabilidade muito baixa à água. Esses resultados mostram que as aquaporinas formam canais de água nas membranas (ver Figura 3.6).

A existência de aquaporinas foi uma surpresa no começo, pois pensava-se que a bicamada lipídica era, por si só, suficientemente permeável à água. No entanto, as aquaporinas são comuns em membranas de plantas e de animais; a expressão e atividade das aquaporinas parece ser regulada possivelmente por fosforilação protéica em resposta à disponibilidade de água (Tyerman e cols., 2002).

A H^+-ATPase da membrana plasmática tem vários domínios funcionais

O transporte ativo e para fora de H^+ através da membrana plasmática cria gradientes de pH e de potencial elétrico que governam o transporte de muitas outras substâncias (íons e moléculas) mediante várias proteínas de transporte ativo secundário. A Figura 6.14 ilustra como uma H^+-ATPase de membrana pode funcionar.

As H^+-ATPases e Ca^{2+}-ATPases da membrana plasmática de plantas e fungos são membros de uma classe conhecida como ATPases tipo P, fosforiladas como parte do ciclo catalítico que hidrolisa ATP. Em decorrência dessa etapa de fosforilação, as ATPases de membranas são fortemente inibidas por ortovanadato (HVO_4^{2-}), um análogo do fosfato (HPO_4^{2-}) que compete com o fosfato do ATP pelo sítio de fosforilação do ácido aspártico da enzima. A alta afinidade da enzima por vanadato é atribuída ao fato de que este pode mimetizar a estrutura transicional do fosfato durante a hidrólise.

As H^+-ATPases da membrana plasmática são codificadas por uma família de cerca de 10 genes, cada um codificando uma isoforma da enzima (Sussman, 1994). As isoformas são específicas para cada tecido e preferencialmente se expressam na raiz, na semente, no floema e assim por diante. A especificidade funcional de cada isoforma ainda não está compreendida; ela pode alterar o pH ótimo de algumas isoformas e permitir que o transporte seja regulado de diferentes formas em cada tecido.

A Figura 6.15 mostra um modelo dos domínios funcionais da H^+-ATPase da membrana plasmática de fermentos, que é similar à das plantas. A proteína tem 10 domínios que atravessam a membrana, fazendo com que ela dê voltas para um lado e para o outro através da membrana. Alguns dos domínios transmembranas constituem a rota pela qual os prótons são bombeados. O domínio catalítico, incluindo o resíduo de ácido aspártico que é fosforilado durante o ciclo catalítico, está na fase citosólica da membrana.

Como outras enzimas, a ATPase da membrana plasmática é regulada pela concentração de substrato (ATP), pH, temperatura e outros fatores. Além disto, moléculas de H^+-ATPase podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas por sinais específicos, como luz, hormônios, ataque de patógenos e similares. Esse tipo de regulação é mediada por um domínio auto-inibitório especializado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica, que age na regulação da atividade da bomba de prótons (ver Figura 6.15).

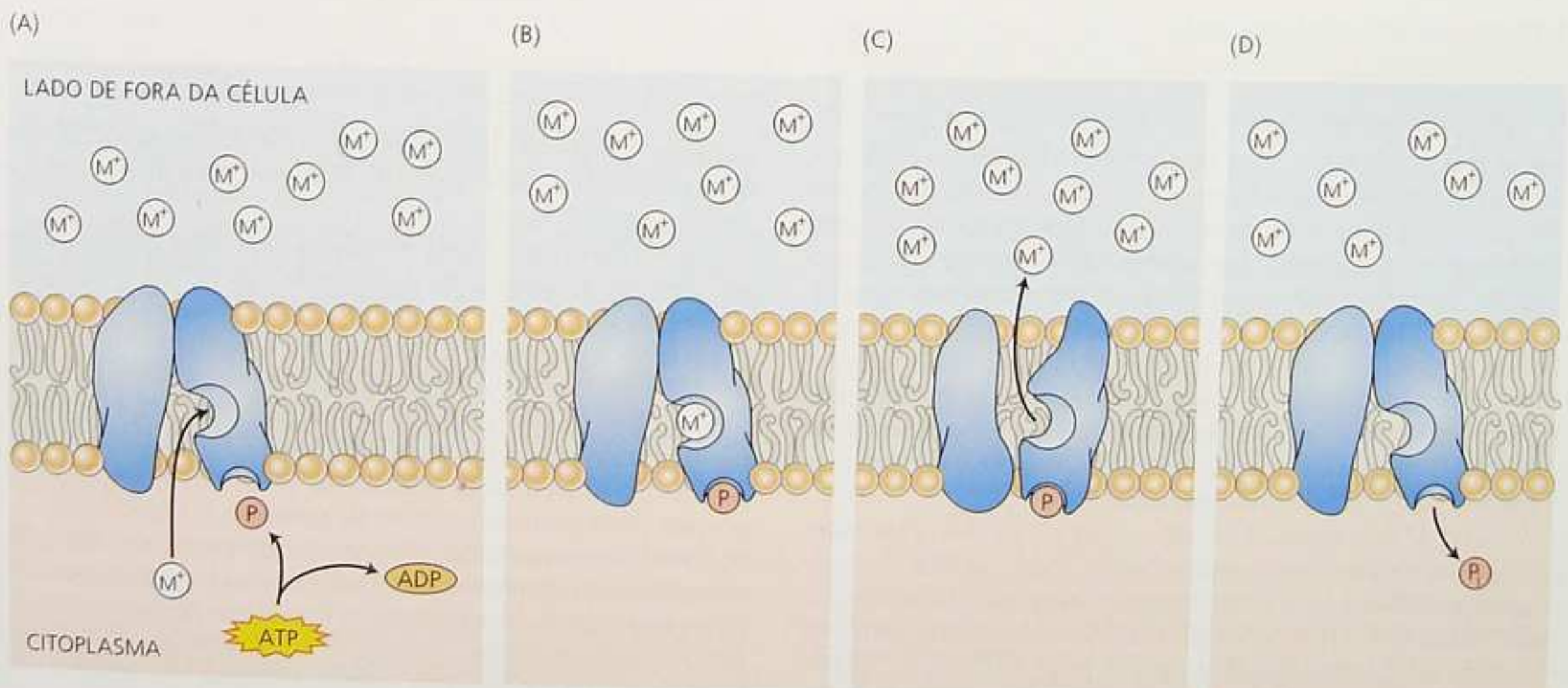



FIGURA 6.14 Etapas hipotéticas no transporte de um cátion (o M^+ hipotético) contra seu gradiente químico através de uma bomba eletrogênica. A proteína, embebida na membrana, liga o cátion no lado de dentro da célula (A) e é fosforilada por ATP (B). Essa fosforilação conduz a uma mudança de conformação que expõe o cátion ao lado de fora da célula e possibilita a sua difusão para longe (C). A liberação do íon fosfato (P) da proteína para o citosol (D) restabelece a configuração inicial da proteína de membrana e permite que um novo ciclo de bombeamento se inicie.

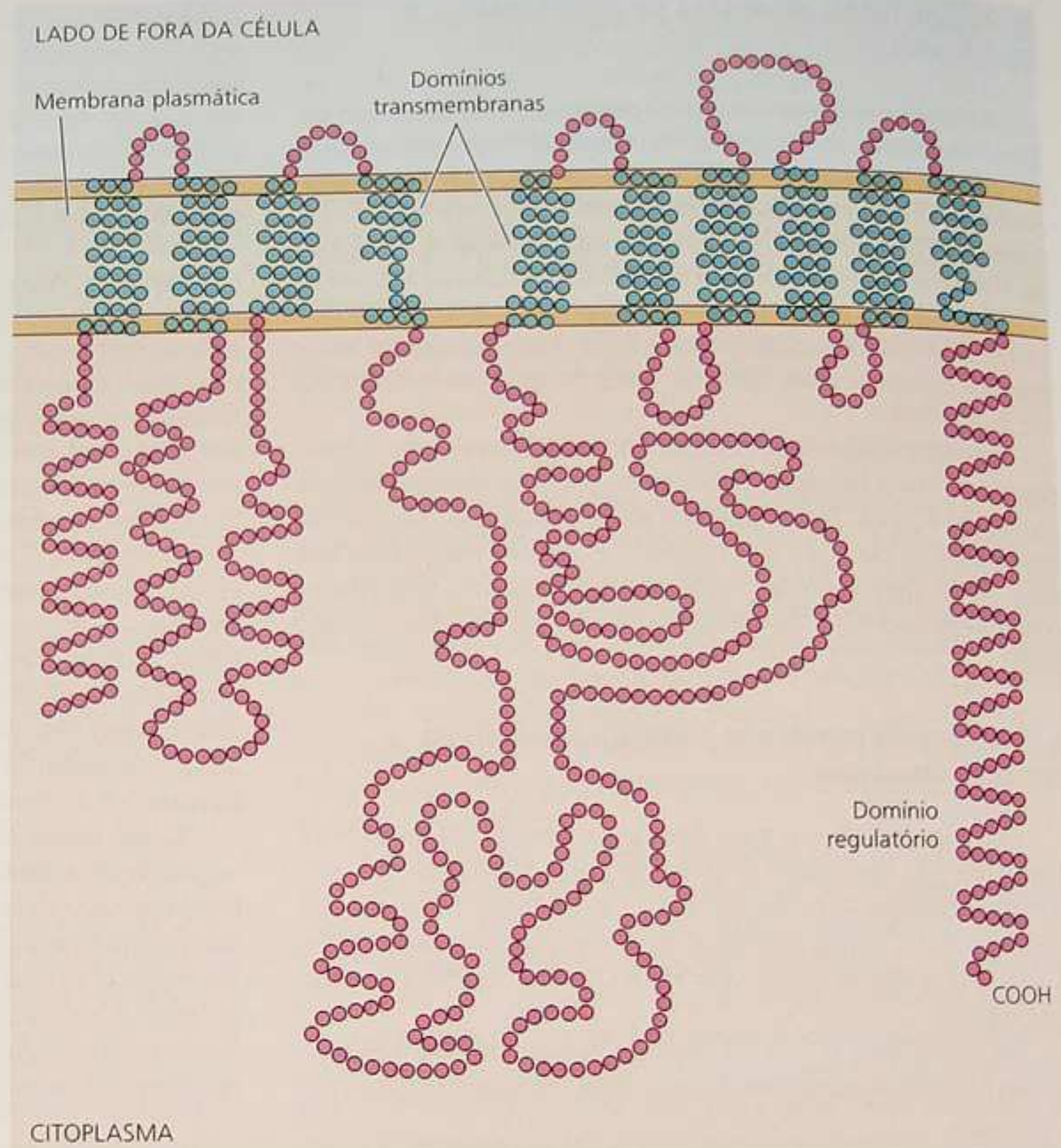
FIGURA 6.15 Representação bidimensional da H^+-ATPase da membrana plasmática. A H^+-ATPase possui 10 segmentos transmembranas. O domínio regulatório é o domínio auto-inibitório (Palmgren, 2001).

Se o domínio auto-inibitório é removido pela ação de uma protease, a enzima torna-se irreversivelmente ativada (Palmgren, 2001).

O efeito auto-inibitório do domínio C-terminal pode ser também regulado pela ação de proteínas quinases e fosfatases, que adicionam ou removem grupos fosfatos nos resíduos de serina ou treonina no domínio auto-inibitório da enzima. Por exemplo, um mecanismo de resposta a patógenos no tomateiro envolve a ativação de proteínas fosfatases, que desfosforilam resíduos na H^+-ATPases da membrana plasmática, assim ativando-a (Vera-Estrella e cols., 1994). Esta é uma etapa em uma cascata de respostas que ativam as defesas da planta.

A H^+-ATPase vacuolar comanda acúmulo de solutos nos vacúolos

Uma vez que as plantas aumentam de tamanho, principalmente pela absorção de água pelos grandes vacúolos centrais, a pressão osmótica do vacúolo precisa ser mantida suficientemente alta para que a água entre do citoplasma para o vacúolo. O tonoplasto regula o trânsito de íons e metabólitos entre o citosol e o vacúolo, da mesma forma que a membrana plasmática regula a absorção pela célula. O transporte no tonoplasto tornou-se um área de intensa pesquisa após o desenvolvimento de métodos de isolamento de vacúolos intactos e de vesículas do tonoplasto (ver **Tópico 6.5 na Internet**). Tais estudos levaram à descoberta de um novo tipo de ATPase bombeadora de prótons, a qual transporta prótons para dentro do vacúolo (ver Figura 6.11).

A H^+-ATPase vacuolar (também chamada de **V-ATPase**) difere tanto estrutural quanto funcionalmente da H^+-ATPase da membrana plasmática. A ATPase vacuolar está mais intimamente relacionada às F-ATPases das mitocôndrias e dos cloroplastos (ver Capítulo 11). Como a hidrólise de ATP pelas ATPases vacuolares não envolve a formação de um intermediário fosforilado, as ATPases vacuolares são insensíveis ao vanadato, o inibidor das ATPases da membrana plasmática já analisada. As ATPases vacuolares são especificamente inibidas pelo antibiótico bafilomicina, assim como por altas concentrações de nitrato, sendo que nenhum deles inibe as ATPases da membrana plasmática. O uso desses inibidores seletivos possibilita a identificação de diferentes tipos de ATPases e o teste de suas atividades.

As ATPases vacuolares pertencem a uma classe geral de ATPases presentes no sistema de endomembranas de todos os eucariontes. Elas são grandes complexos enzimáticos, cerca de 750 kDa, compostos de pelo menos 10 subunidades diferentes (Lüttge e Ratajczak, 1997). Essas subunidades estão organizadas em um complexo catalítico periférico, V_1, e em um complexo integral de membrana formando um canal, V_0 (Figura 6.16). Devido à similaridade com as F-ATPases, presume-se que as ATPases vacuolares operam como pequenos motores de rotação (ver Capítulo 11).

As ATPases vacuolares são bombas eletrogênicas que transportam prótons do citoplasma para vacúolo e geram uma força motriz de prótons através dos tonoplasto. O bombeamento eletrogênico de prótons explica o fato de o vacúolo ser tipicamente 20 a 30 mV mais positivo do que o citoplasma, embora ele ainda seja negativo em relação ao meio externo. Para manter a neutralidade elétrica global, ânions como Cl^- e malato^{2-} são transportados do citoplasma para dentro do vacúolo via canais na membrana (Barkla e Pantoja, 1996). Sem o movimento simultâneo de ânions junto com os prótons bom-

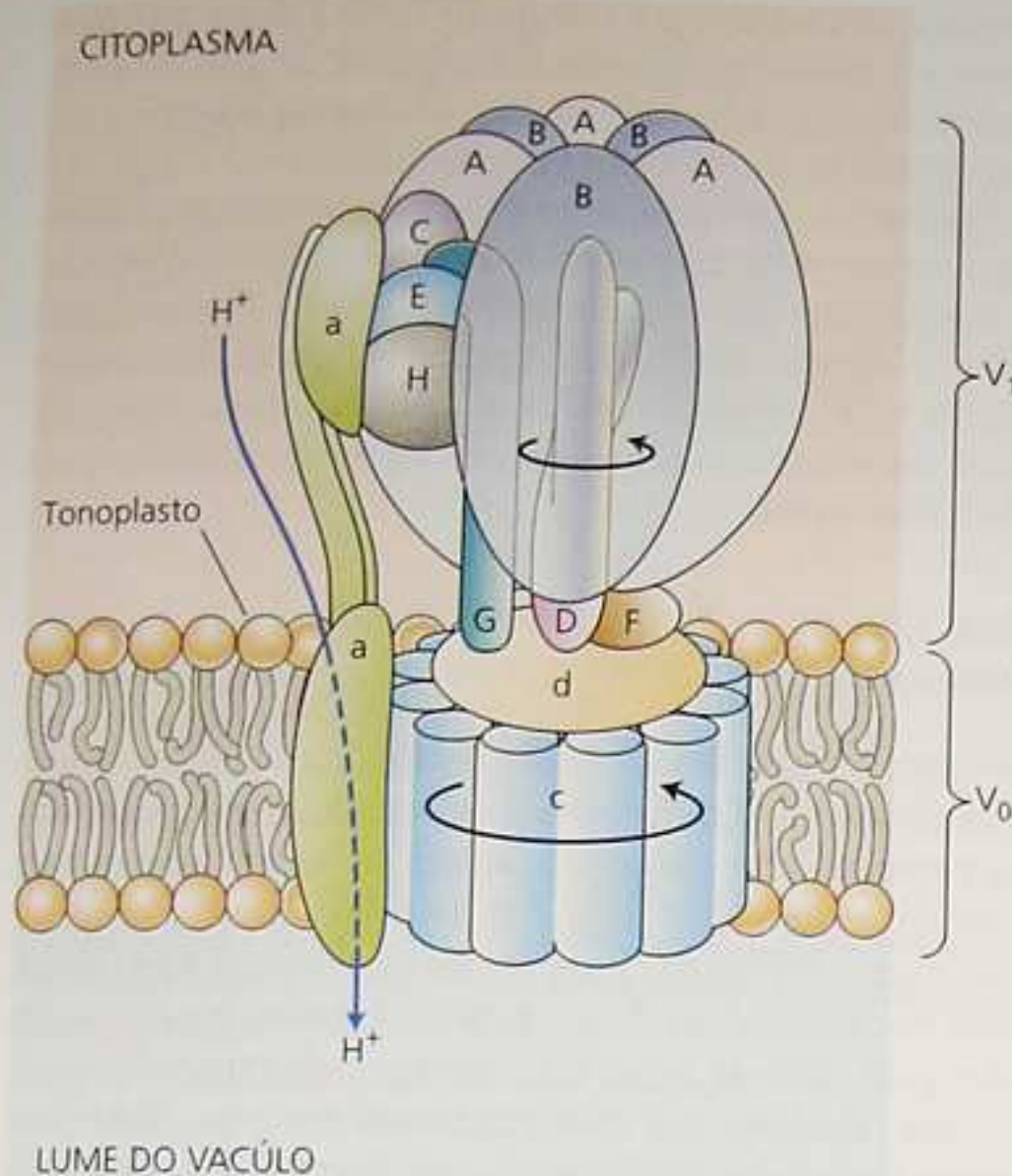



FIGURA 6.16 Modelo do motor de rotação da V-ATPase. Muitas subunidades de polipeptídeos unem-se para formar esta enzima complexa. O complexo catalítico V_1 é facilmente dissociado da membrana e contém os sítios de ligação de nucleotídeos e catalítico. Os componentes de V_1 são designados por letras maiúsculas. O complexo de membrana intrínseco que media o transporte de H^+ é designado V_0, e suas subunidades recebem letra minúscula. Propõe-se que as reações da ATPase catalisadas por cada uma das subunidades, agindo em seqüência, governam a rotação do eixo D e das seis subunidades c. Acredita-se que a rotação das subunidades C em relação à subunidade a governa o transporte de H^+ através da membrana (baseado em ilustração cedida por M. F. Manolson).

beados, o acúmulo de cargas pelo tonoplasto tornaria energeticamente impossível o bombeamento adicional de prótons.

A manutenção da neutralidade elétrica geral pelo transporte de ânions possibilita à H^+-ATPase vacuolar gerar um grande gradiente de concentração (pH) de prótons ao longo do tonoplasto. Este gradiente explica o fato de o pH vacuolar ser tipicamente 5,5, ao passo que o pH citoplasmático é de 7,0 a 7,5. Enquanto o componente elétrico da força-motriz de prótons governa a absorção de ânions pelo vacúolo, o gradiente de potencial eletroquímico para H^+ ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$), é direcionado para governar a absorção de cátions e açúcares pelo vacúolo por sistemas de transporte secundário (transportadores tipo antiporte) (ver Figura 6.11).

Embora o pH da maioria dos vacúolos vegetais seja moderadamente ácido (cerca de 5,5), o pH do vacúolo de algumas espécies é muito menor — fenômeno chamado de *hiperacidificação*. A hiperacidificação vacuolar é a causa do gosto ácido de certas frutas (limões) e verduras (ruibarbo). Alguns exemplos extremos estão listados na Tabela 6.2. Estudos bioquímicos com limões sugeriram que o reduzido pH dos vacúolos do limão (especificamente aqueles das células do gomo) é devido a uma combinação de fatores:

- A baixa permeabilidade da membrana vacuolar a prótons permite que se forme um gradiente mais pronunciado de pH.
- Uma ATPase vacuolar especializada consegue bombear prótons mais eficientemente (com menos desperdício de energia) do que as ATPases vacuolares normais (Müller e cols., 1997).
- O acúmulo de ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico, málico e oxálico, ajuda a manter o baixo pH do vacúolo ao agirem como tampões.

Os vacúolos dos vegetais são energizados por uma segunda bomba de prótons, a H^+-pirofosfatase

Um outro tipo de bomba de prótons, uma H^+-pirofosfatase (H^+-PPase) (Rea e cols., 1998) parece trabalhar paralelamente à ATPase vacuolar para criar o gradiente de prótons ao longo do tonoplasto (ver Figura 6.11). Esta enzima consiste de um polipeptídeo simples que tem uma massa molecular de 80 kDa. A H^+-PPase adquire sua energia da hidrólise de pirofosfato inorgânico (PP_i).

A energia livre liberada pela hidrólise do PP_i é menor do que aquela oriunda da hidrólise de ATP. No entanto, a H^+-PPase vacuolar transporta somente um H^+ por molécula de PP_i hidrolisada, enquanto que a ATPase vacuolar parece transportar dois íons H^+ por ATP hidrolisado. Assim, a energia disponível por íon H^+ transportado parece ser a mesma, e as duas enzimas parecem ser capazes de gerar gradientes de H^+ comparáveis.

Em algumas plantas, a síntese da H^+-PPase vacuolar é induzida por baixos níveis de O_2 (hipoxia), carência de P_i ou pelo frio.

TABELA 6.2
O pH vacuolar de algumas espécies vegetais hiperacidificantes

Tecido	Espécie	pH[a]
Frutos		
	Lima (*Citrus aurantifolia*)	1,7
	Limão (*Citrus limonia*)	2,5
	Cereja (*Prunus cerasus*)	2,5
	Pomelo (*Citrus paradisi*)	3,0
Folhas		
	Azedinha (*Oxalis deppei*)	1,3
	Begônia de cera (*Begonia semperflorens*)	1,5
	Begônia "Lucerna"	0,9-1,4
	Oxalis sp.	1,9-2,6
	Azeda (*Rumex* sp.)	2,6
	Opúncia (*Opuntia phaeacantha*)[b]	1,4(6:45 A.M.) 5,5 (4:00 P.M.)

Fonte: Small, 1946.
[a]Os valores representam o pH do suco ou da seiva expressa de cada tecido, normalmente um bom indicador do pH vacuolar.
[b]O pH vacuolar do cactus *Opuntia phaeacantha* varia com a hora do dia. Conforme será discutido no Capítulo 8, muitas suculentas de deserto têm um tipo de fotossíntese especializada, denominada metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que faz com que o pH do vacúolo decresça durante a noite.

Isto indica que a H^+-PPase vacuolar deve funcionar como um sistema de segurança para manter o metabolismo celular essencial sob condições nas quais o suprimento de ATP é diminuído devido à inibição da respiração (ver **Ensaio 11.1 na Internet**). É interessante que a H^+-PPase vacuolar das plantas não seja encontrada em animais ou fermentos, embora uma enzima similar esteja presente em algumas bactérias e protistas.

Grandes metabólitos, como flavonóides, antocianinas e produtos secundários do metabolismo, são seqüestrados no vacúolo. Estas moléculas grandes são seqüestradas para dentro do vacúolo por **transportadores tipo cassete ligadores** de ATP (transportadores ABC, do inglês *ATP-binding cassete transporters*). Os processos de transporte por transportadores ABC consomem ATP e não dependem de um gradiente eletroquímico primário (ver **Tópico 6.6 na Internet**). Estudos recentes demonstraram que os transportadores ABC podem ser também encontrados na membrana plasmática e em mitocôndrias (Theodoulou 2000).

Bombas transportadoras tipo antiporte e canais de cálcio regulam o cálcio intracelular

O cálcio é um outro íon importante cuja concentração é fortemente regulada. As concentrações de cálcio na parede celular e nos espaços apoplásticos (extracelulares) estão normalmente na faixa milimolar; concentrações de Ca^{2+} citosólico livre são mantidas na faixa micromolar (10^{-6} M), contra o alto gradiente de potencial eletroquímico que governa a difusão de Ca^{2+} para dentro da célula.

Pequenas flutuações na concentração de Ca^{2+} citosólico alteram drasticamente as atividades de muitas enzimas, fazendo do cálcio um importante mensageiro secundário na transdução de sinais. A maioria do cálcio na célula é estocada no vacúolo central, para onde é absorvido por transportadores Ca^{2+}-H^+ tipo antiporte, os quais utilizam o potencial eletroquímico do gradiente de prótons para energizar o acúmulo de cálcio dentro do vacúolo (Bush, 1995). As mitocôndrias e o retículo endoplasmático também armazenam cálcio nas células.

O efluxo de cálcio do vacúolo para o citosol pode ser desencadeado, em algumas células, pelo inositol trifosfato (IP_3). O IP_3, que parece agir como mensageiro secundário em algumas rotas de transdução de sinal, induz a abertura de canais de cálcio no tonoplasto e no retículo endoplasmático, cujo mecanismo de abertura e fechamento é controlado pelo IP_3 (para uma descrição mais detalhada desta rota de transdução sensorial, ver **Capítulo 14 na Internet**).

Cálcio ATPases são encontradas na membrana plasmática (Chung e cols., 2000), assim como em algumas endomembranas das células vegetais (ver Figura 6.11). As células vegetais regulam as concentrações de Ca^{2+} citosólico ao controlar a abertura dos canais de Ca^{2+} que permitem a difusão de cálcio para dentro da célula, assim como modulando a atividade de bombas que retiram Ca^{2+} do citoplasma devolta para os espaços extracelulares. Enquanto as bombas de cálcio da membrana plasmática movimentam o cálcio para fora da célula, as bombas de cálcio no RE transportam cálcio para o lume do RE.

TRANSPORTE DE ÍONS NAS RAÍZES

Os nutrientes minerais absorvidos pelas raízes são carregados para a parte aérea pela corrente de transpiração que se movimenta através do xilema (ver Capítulo 4). Tanto a absorção inicial de nutrientes quanto o movimento subseqüente de íons minerais da superfície da raiz, através do córtex, para dentro do xilema são processos altamente específicos e bem regulados.

O transporte de íons pela raiz obedece às mesmas leis biofísicas que governam o transporte celular. No entanto, conforme foi visto no caso do movimento da água (ver Capítulo 4), a anatomia da raiz impõe algumas limitações especiais na rota de movimento iônico. Nesta seção, serão discutidas as rotas e os mecanismos envolvidos no movimento radial de íons da superfície radicular para os elementos traqueais.

Os solutos movem-se tanto através do apoplasto quanto do simplasto

Até agora a discussão do movimento iônico celular não incluiu a parede celular. Em termos do transporte de pequenas moléculas, a parede celular é uma rede aberta de polissacarídeos pela qual os nutrientes minerais difundem-se prontamente. Por serem as células vegetais separadas por paredes celulares, os íons podem se difundir por intermédio de um tecido (ou serem passivamente carregados pelo fluxo de água) inteiramente pelo espaço ocupado pelas paredes celulares, sem nunca entrarem em uma célula viva. O *continuum* de paredes celulares é denominado *espaço extracelular* ou *apoplasto* (ver Figura 4.3).

É possível determinar-se o volume de apoplasto de uma fatia de tecido vegetal, comparando a absorção de água marcada com ^3H e de manitol marcado com ^{14}C. O manitol é um açúcar alcoólico que não permeia, difundindo-se dentro do espaço extracelular, mas sem poder penetrar as células. A água, por outro lado, penetra livremente tanto as células quanto as paredes celulares. Medições desse tipo geralmente mostram que 5 a 20% do volume de um tecido é ocupado por paredes celulares.

Da mesma maneira que as paredes celulares formam uma fase contínua, os citoplasmas de células vizinhas também o fazem, sendo coletivamente chamados de *simplasto*. As células vegetais são interconectadas por pontes citoplasmáticas denominadas plasmodesmas (ver Capítulo 1), poros cilíndricos de 20 a 60 nm de diâmetro (ver Figura 1.27). Cada plasmodesma é forrado com a membrana plasmática e contém um túbulo estreito, que é a continuação do retículo endoplasmático.

Em tecidos onde ocorrem quantidades significativas de transporte intercelular, células vizinhas contêm numerosos plasmodesmas, até 15 por micrômetro quadrado de superfície celular (Figura 6.17). Células secretoras especializadas, como nectários florais e glândulas de sal foliares, parecem ter altas densidades de plasmodesmas; o mesmo ocorre nas células próximas ao ápice radicular, onde se verifica a maior parte da absorção de nutrientes.

Injetando corantes ou realizando medidas de resistência elétrica em células que contêm grandes números de plasmodesmas, investigadores mostraram que íons, água e pequenos solutos podem se mover de célula para célula por esses poros. Considerando que cada plasmodesma é parcialmente obstruído pelo desmotúbulo e proteínas associadas (ver Capítulo 1), o movimento de moléculas grandes, como as proteínas, através dos plasmodesmas requer mecanismos especiais (Ghoshroy e cols., 1997). Os íons, por outro lado parecem se mover de célula para célula, por meio da planta inteira, por simples difusão através do simplasto (ver Capítulo 4).

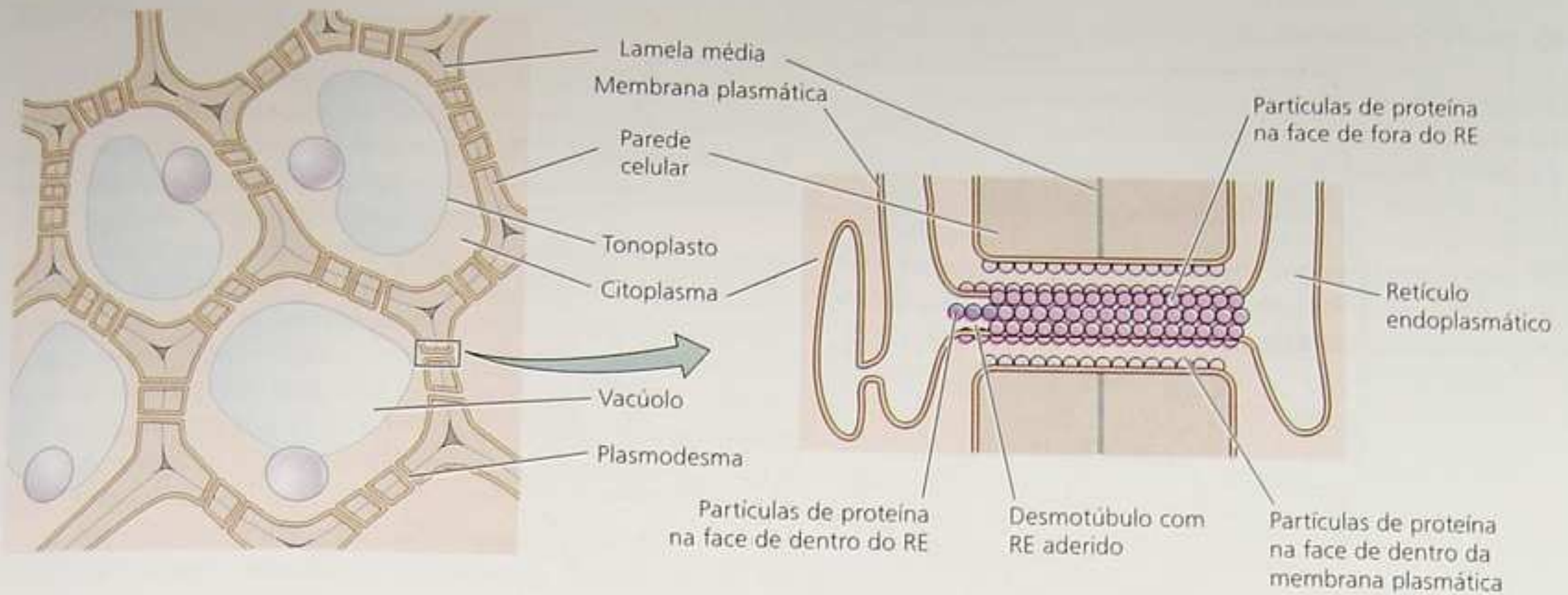



FIGURA 6.17 Diagrama ilustrando como os plasmodesmas conectam os citoplasmas de células vizinhas. Os plasmodesmas têm diâmetro de cerca de 40 nm e permitem a difusão de água e de pequenas moléculas de uma células para a próxima. Além disto, o tamanho da abertura pode ser regulado por rearranjos das proteínas internas, a fim de permitir a passagem de moléculas maiores.

Os íons que se movimentam através das raízes cruzam tanto espaços simplásticos quanto apoplásticos

A absorção de íons pelas raízes (ver Capítulo 5) é mais pronunciada na zona de pêlos radiculares que nas meristemática e de alongamento. As células na zona de pêlos radiculares completaram seu alongamento, mas ainda não iniciaram o crescimento secundário. Os pêlos radiculares são simplesmente extensões de células epidérmicas específicas que aumentam de maneira significativa a área de superfície disponível para a absorção de íons.

Um íon que penetra em uma raiz pode imediatamente entrar no simplasto, cruzando a membrana plasmática de uma célula epidérmica, ou ele pode penetrar no apoplasto e difundir-se por entre as células epidérmicas pelas paredes celulares. Do apoplasto do córtex um íon pode ou cruzar a membrana plasmática de uma célula cortical, assim entrando no simplasto, ou se difundir radialmente até a endoderme via apoplasto. Em todos os casos, os íons precisam ingressar no simplasto antes de entrarem no estelo, devido à presença da estria de Caspary.

O apoplasto forma uma fase contínua da superfície radicular em direção ao córtex. Na fronteira entre o cilindro vascular (o estelo) e o córtex, existe uma camada de células especializadas, a endoderme. Conforme discutido nos Capítulos 4 e 5, essa estrutura suberizada presente em certas paredes celulares da endoderme, conhecida como estria de Caspary, bloqueia efetivamente a entrada de água e íons minerais no estelo via apoplasto.

Uma vez que um íon entrou no estelo por meio das conexões citoplasmáticas que cruzam a endoderme, ele continua a se difundir de célula para célula para dentro do xilema. Finalmente, o íon reingressa no apoplasto, quando se difunde para dentro de uma traqueíde ou elemento de vaso. Mais uma vez, a estria de Caspary impede que um íon se difunda de volta para fora da raiz via apoplasto. A presença da estria de Caspary permite à planta manter uma concentração iônica mais alta no xilema do que a existente na água do solo que circunda as raízes.

As células parenquimáticas do xilema participam do carregamento do xilema

Uma vez que os íons foram absorvidos pelo simplasto da raiz na epiderme ou córtex, eles precisam ser carregados nos traqueídes ou elementos de vaso para serem translocados para a parte aérea. O estelo consiste de elementos traqueais mortos e de células parenquimáticas de xilema vivas. Como os elementos traqueais são células mortas, eles carecem de continuidade citoplasmática com o parênquima do xilema que os circunda. Para entrar nos elementos traqueais, os íons precisam sair do simplasto, atravessando a membrana plasmática uma segunda vez.

O processo pelo qual os íons saem do simplasto e entram nas células condutoras do xilema é denominado **carregamento do xilema.** O mecanismo de carregamento do xilema tem frustrado os cientistas por muito tempo. Os íons poderiam entrar nos traqueídes e elementos de vaso por mera difusão passiva. Nesse caso, o movimento de íons da superfície radicular ao xilema necessitaria de apenas uma etapa com exigência de energia metabólica. O local dessa etapa única de absorção com dependência de energia seria o das superfícies das membranas plasmáticas das células epidérmicas, corticais ou endodérmicas da raiz. De acordo com o modelo de difusão passiva, os íons movimentam-se passivamente no estelo via simplasto, ao longo de um potencial eletroquímico, e então vazam para fora das células vivas do estelo (possivelmente devido à menor disponibilidade de oxigênio no interior da raiz) para dentro das células condutoras não-vivas do xilema.

O suporte para o modelo da difusão passiva foi fornecido pelo uso de microeletrodos com especificidade iônica para medir potenciais eletroquímicos de vários íons ao longo de raízes de milho (Figura 6.18) (Dunlop e Bowling, 1971). Dados deste e de outros estudos indicam que K^+, Cl^-, Na^+, $SO4_2^-$ e NO_3^- são todos absorvidos ativamente pelas células epidérmicas e corticais e mantidos no xilema contra o gradiente eletroquímico, quando comparado com o do meio externo (Lüttge e Higinbothan, 1979). No entanto, ne-

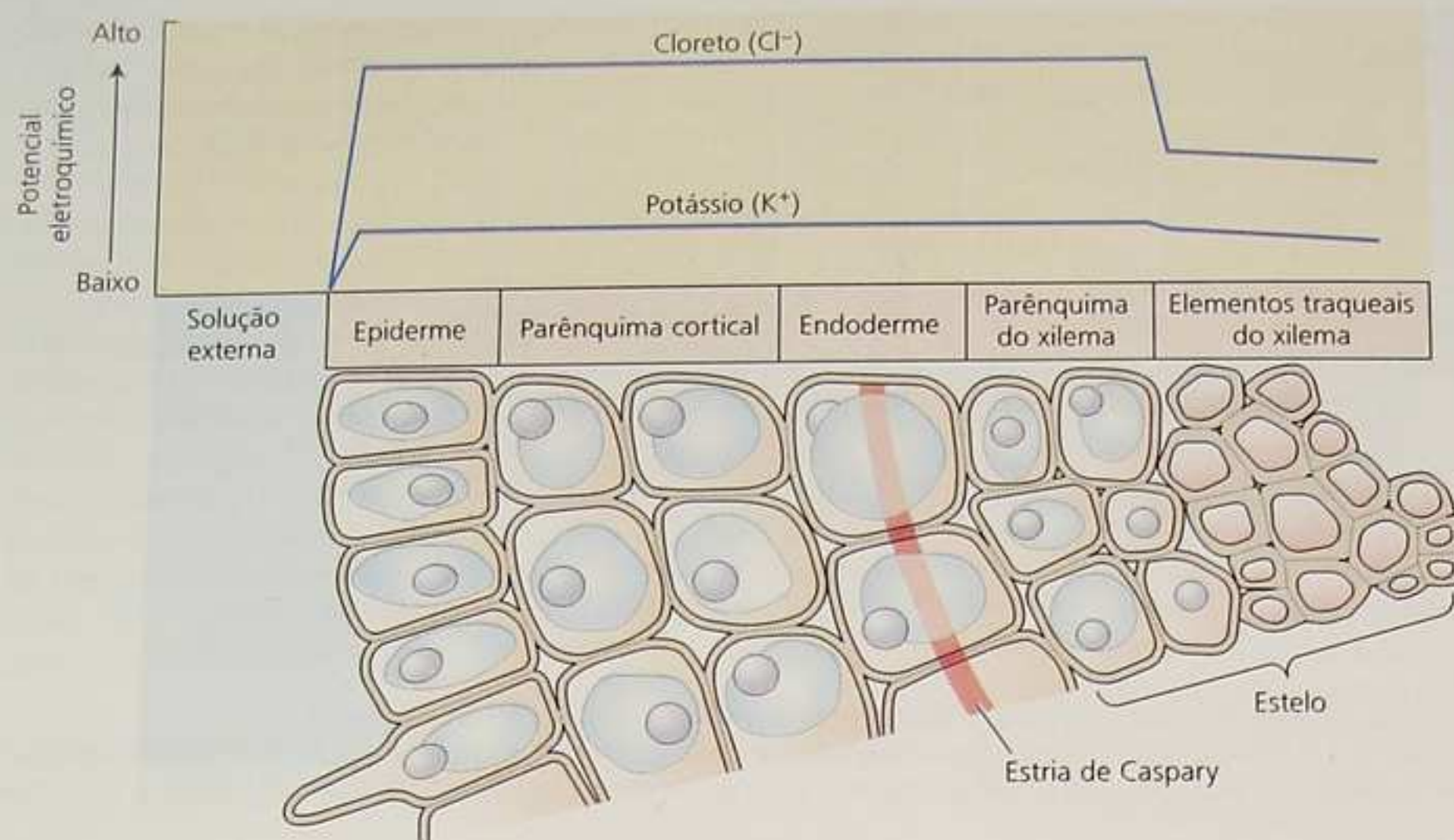



FIGURA 6.18 Diagrama mostrando os potenciais eletroquímicos do K^+ e Cl^- ao longo de uma raiz de milho. Para determinar os potenciais eletroquímicos, a raiz foi banhada em uma solução contendo KCl 1m*M* e $CaCl_2$ 0,1 m*M*. Um eletrodo de referência foi posicionado na solução de banho e um eletrodo de medida, sensível a íons, inserido em diferentes células da raiz. O eixo horizontal mostra os diferentes tecidos encontrados em uma seção transversal de raiz. O aumento substancial no potencial eletroquímico, tanto do K^+ quanto do Cl^- entre o meio do banho e a epiderme indica que os íons são absorvidos pela raiz por um processo de transporte ativo. Nos vasos, ao contrário, potenciais decrescem, sugerindo que os íons são transportados para dentro do xilema por difusão passiva, ao longo de um gradiente favorável de potencial eletroquímico (Dunlop e Bowling, 1971).

nhum desses íons encontra-se com um potencial eletroquímico maior no xilema do que no córtex ou porções vivas do estelo. Portanto, o movimento final de íons par dentro do xilema poderia ser devido à difusão passiva.

Entretanto, outras observações levaram à visão de que a etapa final de carregamento do xilema pode também envolver processos ativos dentro do estelo (Lüttge e Higinbothan, 1979). Com o tipo de aparato ilustrado na Figura 6.19, é possível fazer medições simultâneas de absorção iônica pelo citoplasma epidérmico ou cortical e do carregamento de íons no xilema.

Utilizando tratamentos com inibidores e hormônios vegetais, os pesquisadores mostraram que a absorção de íons pelo córtex e o carregamento de íons no xilema operam independentemente. Por exemplo, o tratamento com o inibidor de síntese protéica ciclo-heximida ou com a citocinina benziladenina inibe o carregamento do xilema, sem afetar a absorção pelo córtex. Este resultado indica que o efluxo das células do estelo é regulado independentemente da absorção pelas células corticais.

Estudos bioquímicos recentes apóiam uma função para as células parenquimáticas do xilema no carregamento do mesmo. As membranas plasmáticas das células do parênquima do xilema contêm bombas de prótons, canais de água e uma variedade de canais iônicos especializados no influxo ou efluxo (Maathuis e cols., 1997). No parênquima do xilema da cevada, dois tipos de canais de efluxo de cátions foram identificados: canais de efluxo específicos para K^+ e canais não-seletivos de efluxo de cátions. Estes canais são regulados pelo potencial de membrana e pela concentração de cálcio citosólico (Boer e Wegner, 1997). Tal descoberta sugere que o fluxo de íons da células de parênquima do xilema para os elementos traqueais do xilema, em vez de se dever a um simples vazamento, está sob forte controle metabólico, através da regulação da H^+-ATPase e dos canais de efluxo iônico da membrana plasmática.

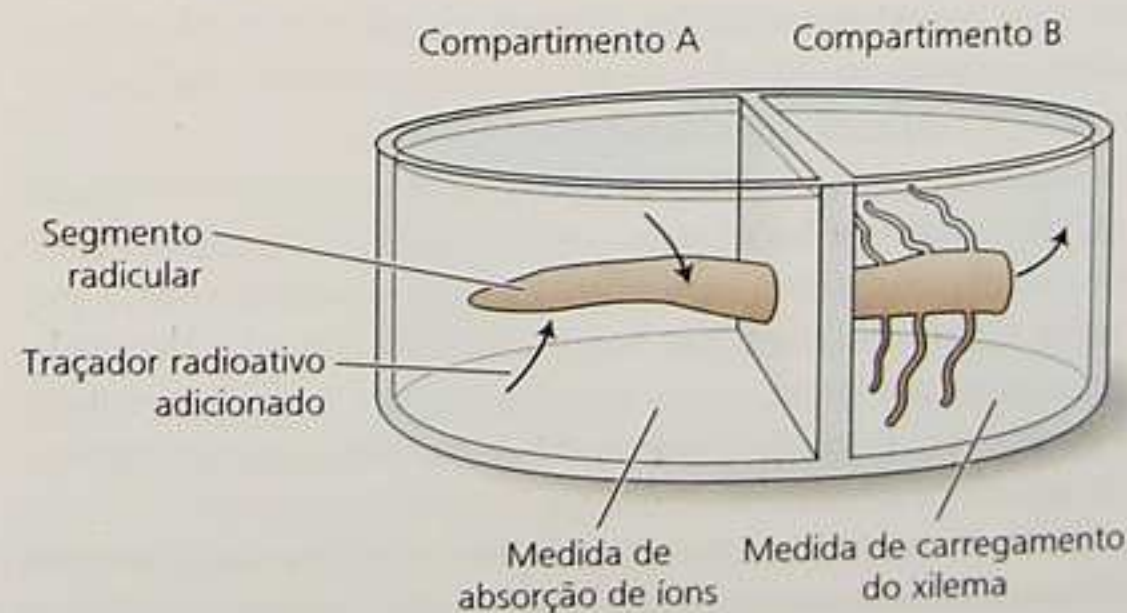



FIGURA 6.19 É possível medir a relação entre absorção iônica pela raiz e carregamento do xilema posicionando um segmento de raiz ao longo de dois compartimentos e adicionando um traçador radioativo em um deles (neste caso, no compartimento A). A taxa de desaparecimento do traçador do compartimento A dá uma medida da absorção iônica e a taxa de desaparecimento do compartimento B fornece uma medida do carregamento do xilema (Lüttge e Higinbothan, 1979).

RESUMO

O movimento de moléculas e de íons de um local para outro é conhecido como transporte. As plantas trocam solutos e água com seus ambientes e entre seus tecidos e órgãos. Tanto processos de transporte locais quanto de longa distância em plantas são amplamente controlados por membranas celulares.

As forças que governam o transporte biológico, que incluem gradientes de concentração, gradientes de potencial elétrico e de pressões hidrostáticas, são integrados em uma expressão chamada de potencial eletroquímico. O transporte de solutos ao longo de um gradiente químico favorável (p. ex., por difusão) é conhecido com transporte passivo. O movimento de solutos contra um gradiente de potencial químico é conhecido como transporte ativo e exige entrada de energia.

A extensão com a qual uma membrana permite ou restringe o movimento de uma substância é denominada permeabilidade de membrana. A permeabilidade depende das propriedades químicas do soluto em questão e da composição lipídica da membrana, assim como das proteínas de membrana que facilitam o transporte de substâncias específicas.

Quando cátions e ânions movem-se passivamente pela membrana a diferentes taxas, o potencial elétrico que se desenvolve é chamado de potencial de difusão. Para cada íon, a relação entre a diferença de voltagem através da membrana e a distribuição do íon no equilíbrio é descrita pela equação de Nernst, a qual mostra que, no equilíbrio, a diferença na concentração de um íon entre dois compartimentos é balanceada pela diferença de voltagem entre os compartimentos. Essa diferença de voltagem ou potencial de membrana é verificada em todas as células vegetais vivas, devido às distribuições assimétricas de íons entre os lados de dentro e de fora das células.

Os efeitos elétricos de diferentes íons que se difundem simultaneamente através de uma membrana celular são somados pela equação de Goldman. As bombas eletrogênicas, que realizam transporte ativo e carregam uma carga líquida, mudam o potencial de membrana criado pela difusão.

As membranas contêm proteínas especializadas — canais, carregadores e bombas — que facilitam o transporte de solutos. Os canais são proteínas de transporte que atravessam a membrana, formando poros através dos quais os solutos difundem-se ao longo de seus gradientes de potencial eletroquímico. Os carregadores ligam um soluto em um lado da membrana e o liberam no outro lado. A especificidade do transporte é determinada em grande parte pelas propriedades dos canais e carregadores.

Uma família de ATPases bombeadoras de H^+ fornece a força propulsora primária para o transporte através da membrana plasmática de células vegetais. Dois outros tipos de bombas eletrogênicas de prótons servem a tal propósito no tonoplasto. As células vegetais também têm ATPases bombeadoras de cálcio que participam da regulação das concentrações intracelulares de cálcio, assim como transportadores tipo cassete ligadores de ATP, que utilizam a energia do ATP para transportar grandes moléculas aniônicas. O gradiente de potencial químico gerado pelo bombeamento de prótons é usado para governar o transporte de outras substâncias em um processo chamado de transporte secundário.

Estudos genéticos revelaram muitos genes e suas proteínas de transporte correspondentes, que explicam a grade versatilidade do transporte vegetal. A eletrofisiologia de *patch clamp* fornece informações singulares sobre os canais iônicos e permite a medida da permeabilidade, assim como de abertura de proteínas de canal individuais.

Os solutos movem-se entre as células ou pelos espaços extracelulares (o apoplasto) ou de citoplasma para citoplasma (via simplasto). Os citoplasmas de células vizinhas são conectados por plasmodesmas, que facilitam o transporte simplástico. Quando um íon entra na raiz, ele pode ser absorvido através do citoplasma de uma célula epidérmica ou ele pode se difundir pelo apoplasto para dentro do córtex radicular e entrar no simplasto por uma célula cortical. Do simplasto, o íon é carregado para dentro do xilema e transportado para a parte aérea.

Material da Internet

Tópicos da Internet

6.1 Relacionando o potencial de membrana à distribuição de vários íons através da membrana: a equação de Goldman
Uma breve explicação do uso da equação de Goldman para calcular a permeabilidade de membrana a mais do que um íon.

6.2 Estudos de *patch clamp* em células vegetais
É descrito o método eletrofisiológico do *patch clamping*, como é aplicado às células vegetais, com alguns exemplos específicos.

6.3 Quimiosmose em ação
A teoria quimiosmótica explica como gradientes elétricos e de concentração são usados para realizar trabalho celular.

6.4 Análise cinética de sistemas de transporte múltiplo
Aplicações dos princípios de cinética enzimática a sistemas de transporte proporciona uma forma efetiva de caracterizar diferentes carregadores.

6.5 Estudos de transporte com vacúolos isolados e vesículas de membrana
Algumas técnicas experimentais permitem o isolamento do tonoplasto e da membrana plasmática para estudo.

6.6 Transportadores ABC em plantas
Transportadores tipo cassete ligadores de ATP (do inglês, *ATP-binding cassete transporters*) são uma grande família de proteínas de transporte ativo energizadas diretamente por ATP.

Ensaio da Internet

6.1 Canais de potássio
Foram caracterizados diversos canais de K^+ em plantas.

Referências bibliográficas

Barkla, B. J., and Pantoja, O. (1996) Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:159-184.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L., eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* Amer. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD.

Bush, D. S. (1995) Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 95-122.

Chrispeels, M. J., Crawford, N. M., and Schroeder, J. I. (1999) Proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. *Plant Cell* 11: 661-675.

Chung, W. S., Lee, S. H., Kim, J. C., Heo, W. D., Kim, M. C., Park, C. Y, Park, H. C., Lim, C. O., Kim, W. B., Harper, J. E, and Cho, M. J. (2000) Identification of a calmodulin-regulated soybean Cat+ATPase (SCA1) that is located in the plasma membrane. *Plant Cell* 12:1393-1407.

De Boer, A. H., and Wegner, L. H. (1997) Regulatory mechanisms of ion channels in xylem parenchyma cells. *J. Exp. Bot.* 48: 441-449.

Dunlop, J., and Bowling, D. J. F. (1971) The movement of ions to the xylem exudate of maize roots. *J. Exp. Bot.* 22: 453-464.

Ghoshroy, S., Lartey R., Sheng, J., and Citovsky V (1997) Transport of proteins and nucleic acids through plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 27-50.

Higinbotham, N., Etherton, B., and Foster, R. J. (1967) Mineral ion contents and cell transmembrane eleciropotentials of pea and oat seedling tissue. *Plant Physiol.* 42: 37-16.

Higinbotham, N., Graves, J. S., and Davis, R. F. (1970) Evidence for an electrogenic ion transport pump in cells of higher plants. *J. Membr. Biol.* 3: 210-222.

Hirshi, K. D., Zhen, R.-G., Rea, P A., and Fink, G. R. (1996) CAM, an H+/Caz+ antiporter from Arabidopsis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 8782-8786.

Kochian, L. V (2000) Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport and utilization. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1204-1249.

Kuehn, C., Barker, L., Buerkle, L., and Frommer, W. B. (1999) Update on sucrose transport in higher plants. *J. Exp. Bot.* 50: 935-953.

Leng, Q., Mercier, R. W., Hua, B-G., Fromm, H., and Berkowitz, G. A. (2002) Electrophysical analysis of cloned cyclic nucleotidegated ion channels. *Plant Physiol.* 128: 400-410.

Lin, W., Schmitt, M. R., Hitz, W. D., and Giaquinta, R. T. (1984) Sugar transport into protoplasts isolated from developing soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 75: 936-940.

Liittge, U., and Higinbotham, N. (1979) *Transport in Plants*. SpringerVerlag, New York.

Luttge, U., and Ratajczak, R. (1997) The physiology, biochemistry and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. *Adv. Bot. Res.* 25: 253-296.

Maathuis, F. J. M., Ichida, A. M., Sanders, D., and Schroeder, J. I. (1997) Roles of higher plant K+ channels. *Plant Physiol.* 114: 1141-1149.

Muller, M., Irkens-Kiesecker, U., Kramer, D., and Taiz, L. (1997) Purification and reconstitution of the vacuolar HI-ATPases from lemon fruits and epicotyls. *J. Biol. Chem.* 272: 12762-12770.

Nobel, P (1991) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, San Diego, CA.

Palmgren, M. G. (2001) Plant plasma membrane H+-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 817-845.

Rea, P A., Li, Z-S., Lu, Y -P, and Drozdowicz, Y M.(1998) From vacuolar Gs-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 727-760.

Small, J. (1946) *pH and Plants, an Introduction to Beginners*. D. Van Nostrand, New York.

Spanswick, R. M. (1981) Electrogenic ion pumps. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32:267-289.

Sussman, M. R. (1994) Molecular analysis of proteins in the plant plasma membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 211-234.

Tanner, W., and Caspari, T. (1996) Membrane transport carriers. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 595-626.

Tazawa, M., Shimmen, T., and Mimura, T. (1987) Membrane control in the Characeae. *Annu. Rev. Plant Phsyiol.* 38: 95-117.

Theodoulou, F. L. (2000) Plant ABC transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 79-103.

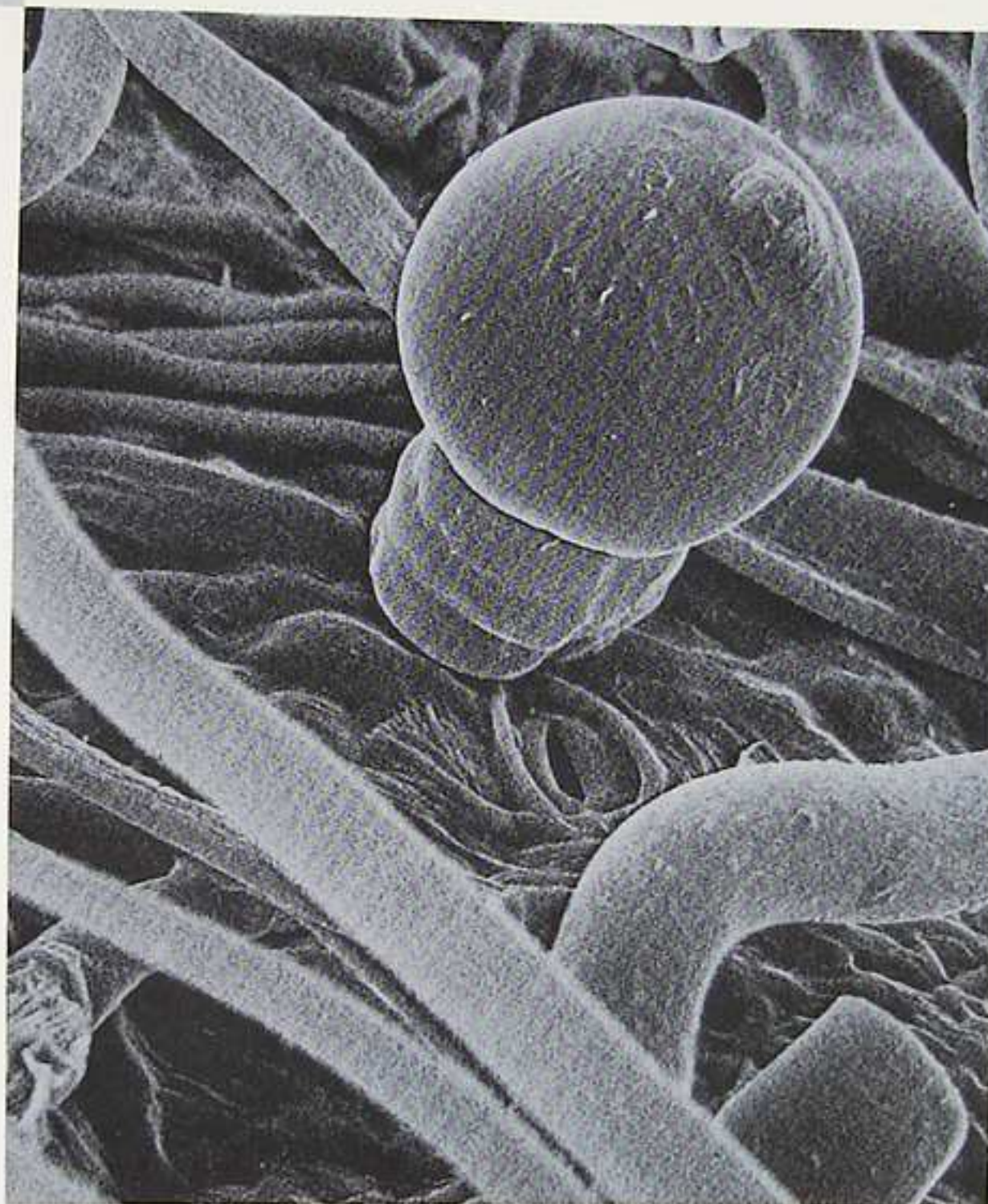
Tyerman, S. D., Niemietz, C. M., and Bramley, H. (2002) Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Envir.* 25:173-194.

Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Higgins, V J., and Blumwald, E. (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Activation of hostplasma-membrane H^+-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol.* 104: 209-215.

PARTE

III

Bioquímica e metabolismo

Capítulo

7 Fotossíntese: as reações luminosas

A VIDA NA TERRA DEPENDE, EM ÚLTIMA ANÁLISE, DA ENERGIA proveniente do sol. A fotossíntese é o único processo de importância biológica que pode aproveitar essa energia. Pode-se ainda dizer que uma grande fração dos recursos energéticos do planeta resulta da atividade fotossintética em épocas recentes ou passadas (combustíveis fósseis). Este capítulo introduz os princípios físicos que fundamentam o armazenamento de energia fotossintética, bem como os conhecimentos recentes sobre a estrutura e a função do aparelho fotossintético (Blackenship, 2002).

O termo *fotossíntese* significa, literalmente, "síntese utilizando a luz". Como será visto neste capítulo, os organismos fotossintetizantes utilizam a energia solar para sintetizar compostos carbonados que não poderiam ser formados sem um *input* de energia. Mais especificamente, a energia luminosa dirige a síntese de carboidratos a partir de dióxido de carbono e água com a liberação de oxigênio:

$$\underset{\text{dióxido de carbono}}{6\,CO_2} + \underset{\text{água}}{6\,H_2O} \rightarrow \underset{\text{carboidrato}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{oxigênio}}{6\,O_2}$$

A energia armazenada nessas moléculas pode ser utilizada mais tarde para impulsionar processos celulares na planta e servir como fonte de energia para todas as formas de vida.

Este capítulo trata do papel da luz na fotossíntese, a estrutura do aparelho fotossintético e os processos que se iniciam com a excitação da clorofila pela luz e culminam na síntese de ATP e NADPH.

FOTOSSÍNTESE NAS PLANTAS SUPERIORES

O mais ativo dos tecidos fotossintéticos das plantas superiores é o mesofilo. As células do mesofilo possuem muitos cloroplastos, os quais contêm os pigmentos verdes especializados na absorção da luz, as **clorofilas**. Durante a fotossíntese, a planta utiliza a energia solar para oxidar a água, liberando conseqüentemente oxigênio, e para reduzir o dióxido de carbono, assim produzindo grandes compostos carbonados, sobretudo açúcares. A complexa série de reações, que culmina na redução do CO_2, inclui as reações nos tilacóides e as de fixação do carbono.

As **reações da fotossíntese nos tilacóides** ocorrem em membranas internas especializadas dos cloroplastos denominadas tilacóides (ver Capítulo 1). Os produtos finais de tais reações são os compostos de alta energia ATP e NADPH, os quais são utilizados para a síntese dos açúcares nas **reações de fixação do carbono**. Esses processos de síntese ocorrem no estroma dos cloroplastos, a região aquosa que circunda os tilacóides. As reações da fotossíntese nos tilacóides são o conteúdo deste capítulo; enquanto as reações de fixação do carbono serão discutidas no Capítulo 8.

Nos cloroplastos, a energia luminosa é convertida em energia química por meio de unidades funcionais chamadas de fotossistemas. A luz absorvida é utilizada para impulsionar a transferência de elétrons por uma série de compostos que atuam como doadores e aceptores desses elétrons. A maioria dos elétrons, em última análise, reduz NADP+ a NADPH e oxida H_2O a O_2. A energia luminosa também é utilizada para gerar a força motora de prótons (ver Capítulo 6) através da membrana do tilacóide, a qual será utilizada para formar ATP.

FIGURA 7.1 Luz é uma onda eletromagnética transversal, que consiste em campos elétrico e magnético perpendiculares um ao outro e à direção de propagação da luz. A luz move-se a uma velocidade de 3×10^8 m s^{-1}. O comprimento de onda (λ) é a distância entre sucessivos picos de onda.

CONCEITOS GERAIS

Nesta seção, serão explorados os conceitos essenciais que fornecem a base para a compreensão da fotossíntese. Tais conceitos incluem a natureza da luz, as propriedades dos pigmentos e as várias funções dos pigmentos.

A luz possui características tanto de partícula quanto de onda

Um triunfo da física no início do século XX foi a descoberta que a luz possui características tanto de partículas quanto de ondas. Uma onda (Figura 7.1) é caracterizada por um **comprimento de onda**, representado pela letra grega lambda (l), que é a distância entre dois picos sucessivos. A **freqüência**, representada pela letra grega nu (v), é o numero de picos que passam por um observador em um dado espaço tempo. Uma equação simples relaciona o comprimento, a freqüência e a velocidade de qualquer onda:

$$c = \lambda v \qquad (7.1)$$

onde c é a velocidade da onda — neste caso, a velocidade da luz ($3,0 \times 10^8$ m s^{-1}). A onda de luz é uma onda eletromagnética transversal (lado a lado), onde os campos magnético e elétrico oscilam perpendicularmente à direção da propagação da onda e a um ângulo de 90° com relação uma a outra.

A luz é também uma partícula, a qual denominamos **fóton**. Cada fóton contém uma quantidade de energia que é chamada de **quantum** (plural: *quanta*). O conteúdo de energia da luz não é contínuo, mas emitido em pequenos "pacotes", os quanta. A energia (E) de um fóton depende da freqüência de vibração da luz de acordo com a relação conhecida como a lei de Planck:

$$E = hv \qquad (7.2)$$

onde h é a constante de Planck ($6,626 \times 10n^{-34}$ J s).

A luz solar é como uma chuva de fótons de diferentes freqüências. Nossos olhos são sensíveis a apenas uma pequena faixa de freqüências — a região da luz visível do espectro eletromagnético (Figura 7.2). A luz com freqüências levemente superiores (ou comprimentos de onda mais curtos) está na faixa do ultravioleta e a luz com freqüências levemente inferiores (comprimentos de onda mais longos) está na faixa do infravermelho. A radiação global emitida pelo sol é mostrada na Figura 7.3, juntamente com a densidade de energia que chega à superfície da Terra. O espectro de absorção da clorofila *a* (curva C na Figura 7.3) indica aproximadamente a porção da radiação solar utilizada pelas plantas.

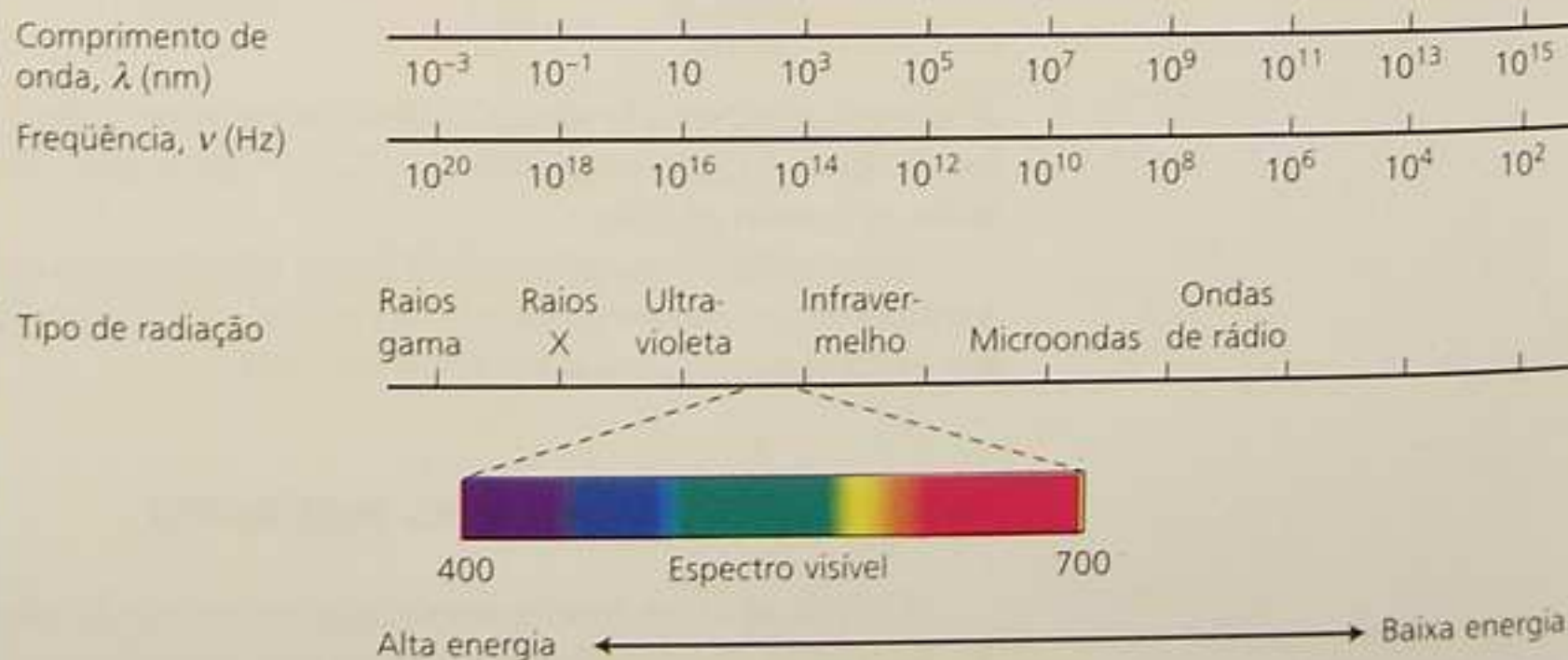



FIGURA 7.2 Espectro eletromagnético. Comprimento de onda (λ) e freqüência (ν) são inversamente relacionados. O olho humano é sensível a apenas uma estreita faixa de comprimentos de onda da radiação, a região visível, que se estende de aproximadamente 400 nm (violeta) a aproximadamente 700 nm (vermelho). A luz de comprimentos de onda curtos (alta freqüência) possui alta energia; a luz de comprimentos de onda longos (baixa freqüência) possui baixa energia.

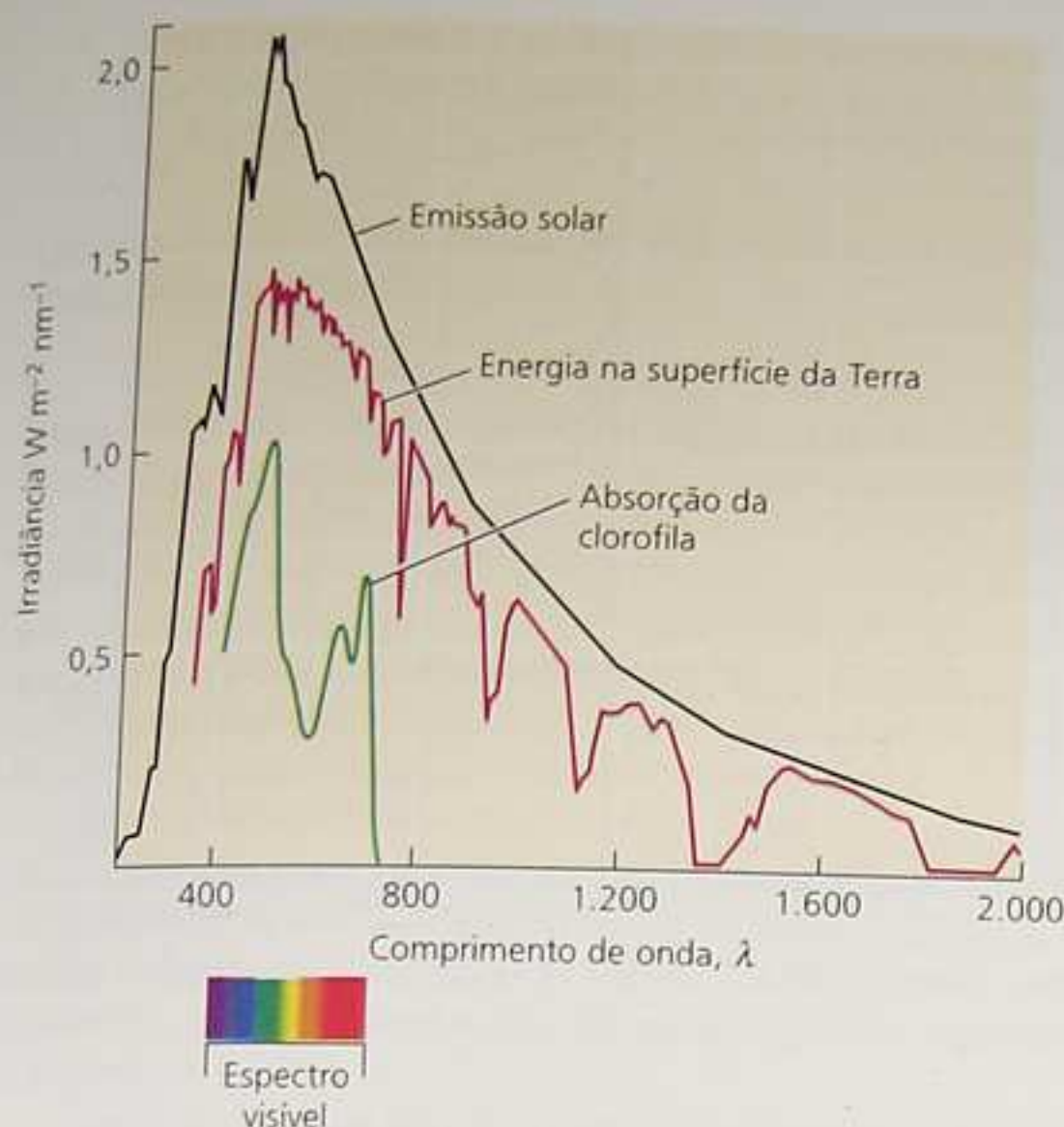



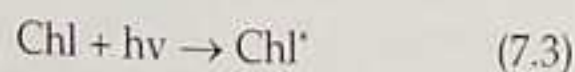
FIGURA 7.3 O espectro solar e sua relação com o espectro de absorção da clorofila. A curva A representa a emissão de energia pelo sol em função do comprimento de onda. A curva B é a energia que atinge a superfície da Terra. Os íngremes vales na região do infravermelho além dos 700 nm representam a absorção da energia solar pelas moléculas da atmosfera, principalmente vapor de água. A curva C é o espectro de absorção da clorofila, a qual absorve fortemente nas regiões do azul (aproximadamente 430 nm) e do vermelho (aproximadamente 660 nm) do espectro. Devido à pouca eficiência na absorção da luz verde na faixa intermediária da região do visível, a maior parte da mesma é refletida para o olho humano e dá às plantas sua coloração verde característica.

Um **espectro de absorção** mostra a quantidade de energia luminosa captada ou absorvida por uma molécula ou substância em função do comprimento de onda da luz. O espectro de absorção de uma determinada substância em um solvente não-absorvente pode ser determinado com um espectrofotômetro, conforme ilustrado na Figura 7.4. A espectrofotometria, técnica utilizada para medir a absorção da luz por uma amostra, é discutida de modo mais completo no **Tópico 7.1 na Internet**.

Quando as moléculas absorvem ou emitem luz, elas alteram seu estado eletrônico

A clorofila parece verde porque ela absorve luz principalmente nas porções vermelha e azul dos espectros, de forma que apenas uma parte da luz enriquecida nos comprimentos de onda do verde (aproximadamente 550 nm) é refletida para o olho humano (ver Figura 7.3).

A absorção da luz está representada na Equação 7.3, onde a clorofila (Clor) em seu estado de menor energia, ou base, absorve um fóton (representado por $h\nu$) e faz uma transição para um estado de maior energia ou excitado (Clor*):

$$\text{Chl} + h\nu \rightarrow \text{Chl}^* \qquad (7.3)$$

A distribuição de elétrons na molécula excitada é, de certa forma, diferente da distribuição da molécula em estado-base (Figura 7.5). A absorção da luz azul excita a clorofila a um estado energético mais elevado que a absorção de luz vermelha, pois a energia dos fótons é maior quando seus comprimentos de onda são menores. No estado excitado, a clorofila é extremamente instável e rapidamente libera parte de sua energia ao meio como calor, entrando em um estado de menor excitação no qual pode permanecer estável por um máximo de alguns nanossegundos (10^{-9} s). Devido a essa inerente instabilidade do estado excitado, qualquer processo que capture sua energia deve ser extremamente rápido.

No estado de menor excitação, a clorofila excitada possui quatro alternativas de rotas para liberar a energia disponível.

1. A clorofila excitada pode reemitir um fóton e, assim, retornar ao seu estado-base — um processo conhecido como **fluorescência.** Quando isto acontece, o comprimento de onda da fluorescência é levemente mais longo (e com menor energia) do que o comprimento de onda absorvido, pois uma parte da energia de excitação é convertida em calor antes da emissão do fóton fluorescente. A clorofila fluoresce na região vermelha do espectro.
2. A clorofila excitada pode retornar ao seu estado-base por conversão direta de sua energia de excitação em calor, sem a emissão de um fóton.
3. A clorofila pode participar **da transferência de energia,** durante a qual uma molécula excitada de clorofila transfere sua energia para outra molécula.
4. Um quarto processo é o **fotoquímico,** no qual a energia do estado excitado provoca a ocorrência de reações químicas. As reações fotoquímicas da fotossíntese estão entre as reações químicas mais rápidas conhecidas. Essa velocidade ex-

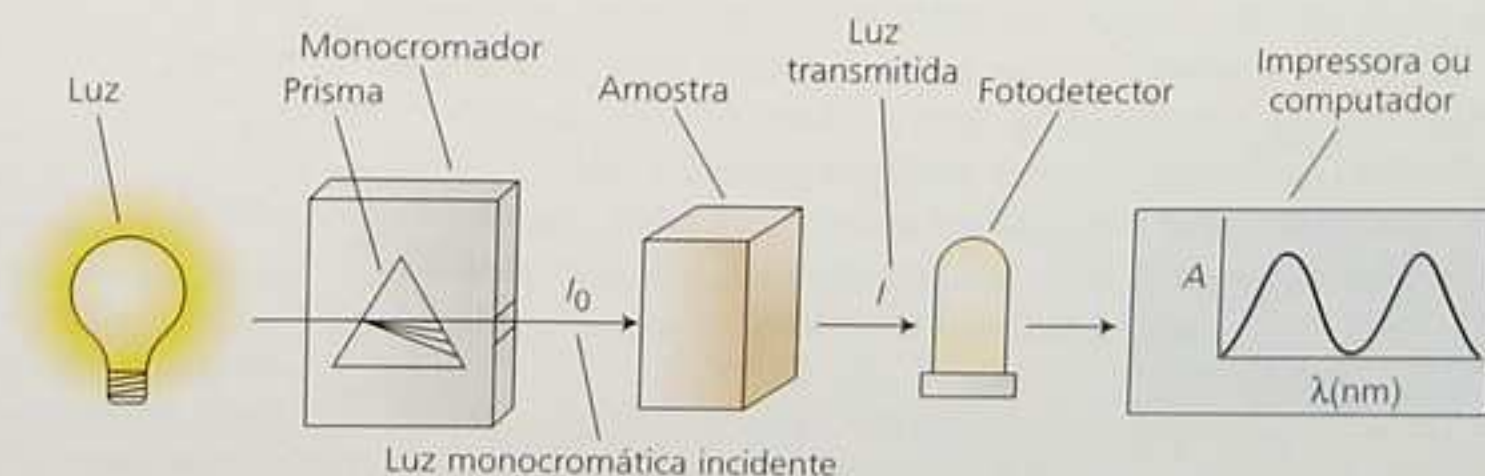
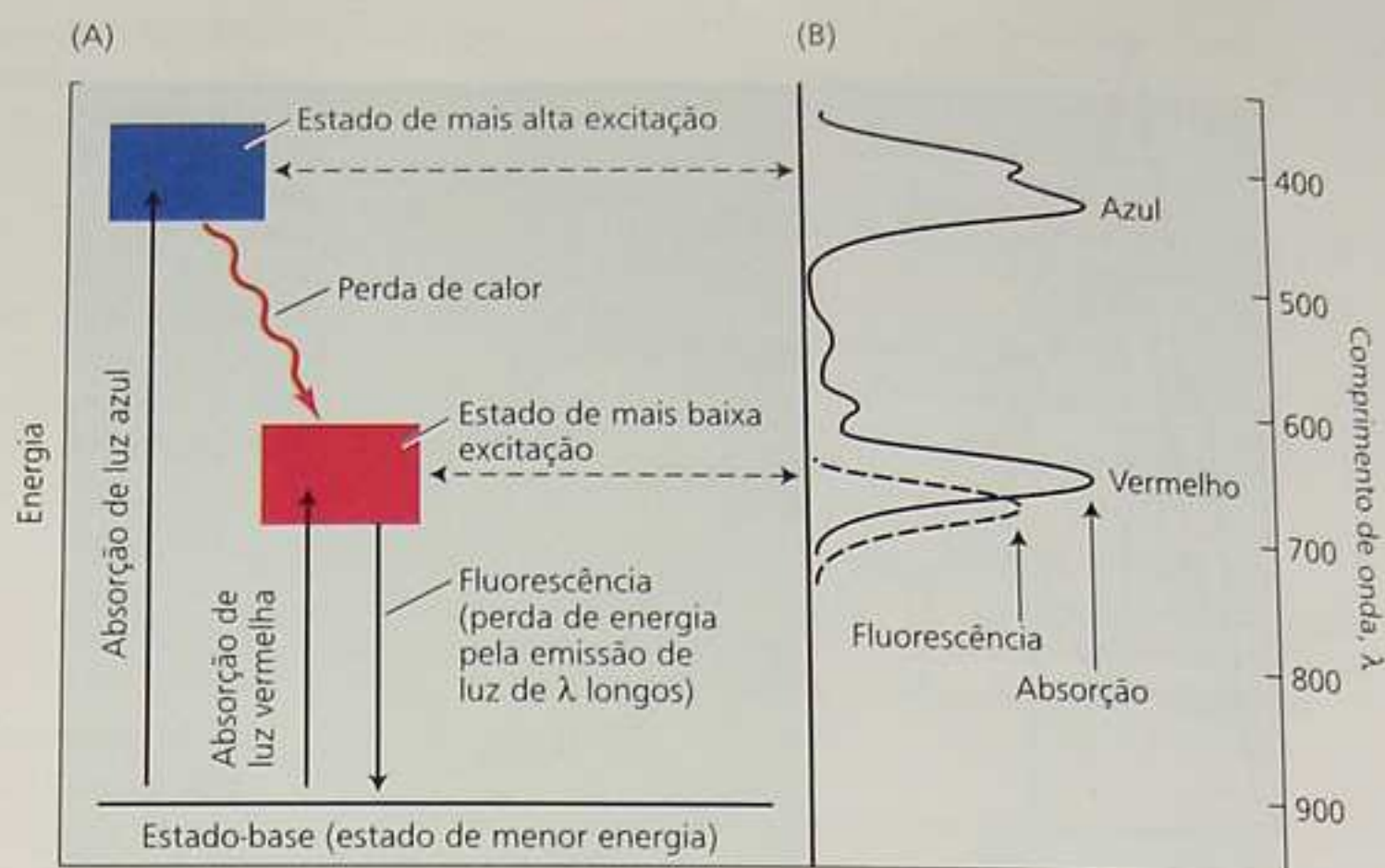
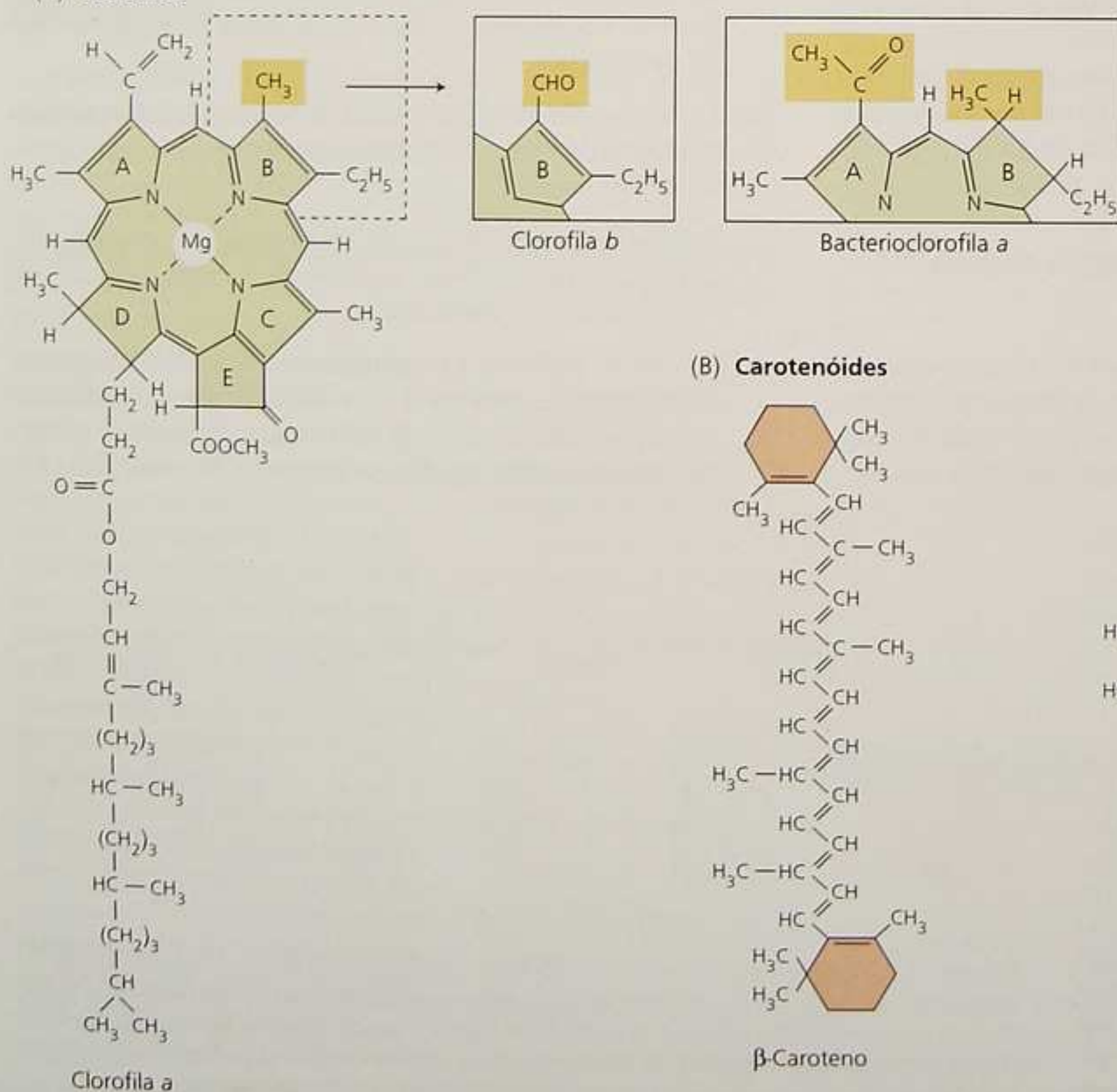
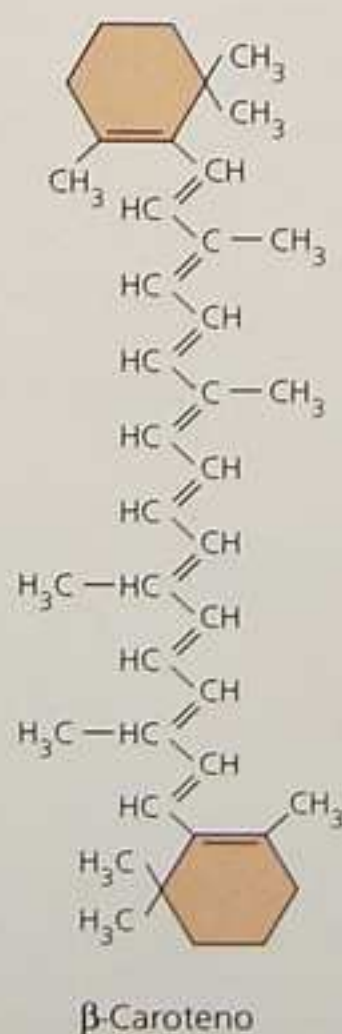
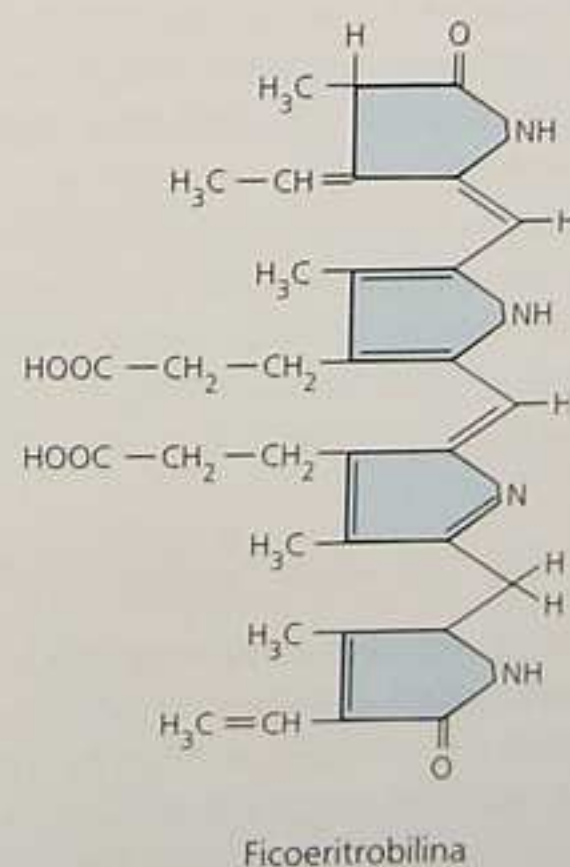



FIGURA 7.4 Diagrama esquemático de um espectrofotômetro. O instrumento consiste de uma fonte luminosa, um monocromador que contém o seletor de comprimentos de onda tipo prisma, um receptáculo para amostras, um fotodetector e uma impressora ou computador. O comprimento da onda emitido pelo monocromador pode ser alterado por rotação do prisma; o gráfico de absorbância (A) *versus* comprimento de onda (λ) é denominado espectro.

FIGURA 7.5 Absorção e emissão de luz pela clorofila. (A) Diagrama mostrando o nível energético. A absorção ou emissão de luz é indicada pelas linhas verticais que conectam o estado-base com os estados excitados dos elétrons. As bandas de absorção da clorofila no azul e no vermelho (que absorvem fótons azuis e vermelhos, respectivamente) correspondem às setas verticais para cima, significando que a energia absorvida da luz provoca uma alteração na molécula do estado-base para um estado excitado. As setas que apontam para baixo indicam fluorescência, onde a molécula vai do estado de baixa excitação para o estado-base, enquanto reemite energia na forma de fótons. (B) Espectros de absorção e fluorescência. A banda de absorção nos comprimentos de onda longos (vermelho) da clorofila corresponde à luz que possui a energia necessária para causar a transição do estado-base para o primeiro estado de excitação. A banda de absorção nos comprimentos de onda curtos (azul) corresponde à transição para o estado de alta excitação.

trema faz-se necessária para que a fotoquímica possa competir com as outras três reações possíveis do estado excitado, já descritas.

Os pigmentos fotossintetizantes absorvem a luz que impulsiona a fotossíntese

A energia da luz solar é primeiramente absorvida pelos pigmentos da planta. Todos os pigmentos ativos no processo de fotossíntese são encontrados nos cloroplastos. As estruturas e o espectro de absorção de vários destes pigmentos podem ser vistos nas Figuras 7.6 e 7.7, respectivamente. As clorofilas e as **bacterioclorofilas** (pigmentos encontrados em algumas bactérias) são os pigmentos típicos dos organismos fotossintéticos, mas todos os organismos possuem uma mistura de mais de um tipo de pigmento, cada um desempenhando uma função específica.

As clorofilas *a* e *b* são abundantes nas plantas verdes, e as *c* e *d* são encontradas em alguns protistas e cianobactérias. Um número de tipos diferentes de bacterioclorofilas já foi encontrado; o tipo *a* é o mais amplamente distribuído. O **Tópico 7.2 na Internet** mostra a distribuição de pigmentos dos diferentes tipos de organismos fotossintéticos.

Todas as clorofilas têm uma complexa estrutura em anel, que é quimicamente relacionada com os grupos tipo porfirina encontrados na hemoglobina e nos citocromos (ver Figura 7.6A). Além disso, uma longa cauda de hidrocarbonetos está quase sempre ligada à estrutura do anel. A cauda ancora a clorofila à porção hidrofóbica de seu ambiente. A estrutura em anel contém alguns elétrons fouxamente ligados, além de ser a parte envolvida na transição de elétrons e nas reações redox.

Os diferentes tipos de **carotenóides** encontrados nos organismos fotossintéticos são em sua totalidade moléculas lineares com múltiplas cadeias duplas conjugadas (ver Figura 7.6B). As bandas de absorção na região dos 400 a 500 nm imprimem nos carotenóides sua coloração alaranjada característica. A cor das cenouras, por exemplo, deve-se ao β-caroteno, um carotenóide cuja estrutura e espectro de absorção são mostrados nas Figuras 7.6 e 7.7, respectivamente.

Os carotenóides são encontrados em todos os organismos fotossintéticos, exceto em mutantes incapazes de sobreviver fora dos laboratórios. Os carotenóides constituem integralmente as membranas dos tilacóides e estão, em geral, intimamente associados aos pigmentos protéicos das antenas e dos centros de reação. A luz absorvida pelos carotenóides é transferida à clorofila para o processo de fotossíntese; em decorrência do papel que desempenham são chamados de **pigmentos acessórios.**

◀ **FIGURA 7.6** Estrutura molecular de alguns pigmentos fotossintéticos. (A) As clorofilas possuem uma estrutura de anel tipo porfirina com um átomo de magnésio (Mg) coordenado no centro e uma longa cauda de hidrocarbonetos hidrofóbicos que as ancora nas membranas fotossintéticas. O anel tipo porfirina é o sítio dos rearranjos eletrônicos que ocorrem quando a clorofila é excitada e dos elétrons não-pareados quando está oxidada ou reduzida. As várias clorofilas diferem principalmente nos substituintes ao redor dos anéis e nos padrões de ligações duplas. (B) Os carotenóides são polienos lineares que servem tanto como pigmentos das antenas como agentes protetores. (C) Os pigmentos bilinas são tetrapirróis de cadeia aberta encontrados nas antenas e conhecidos como ficobilissomos, que ocorrem nas cianobactérias e nas algas vermelhas.

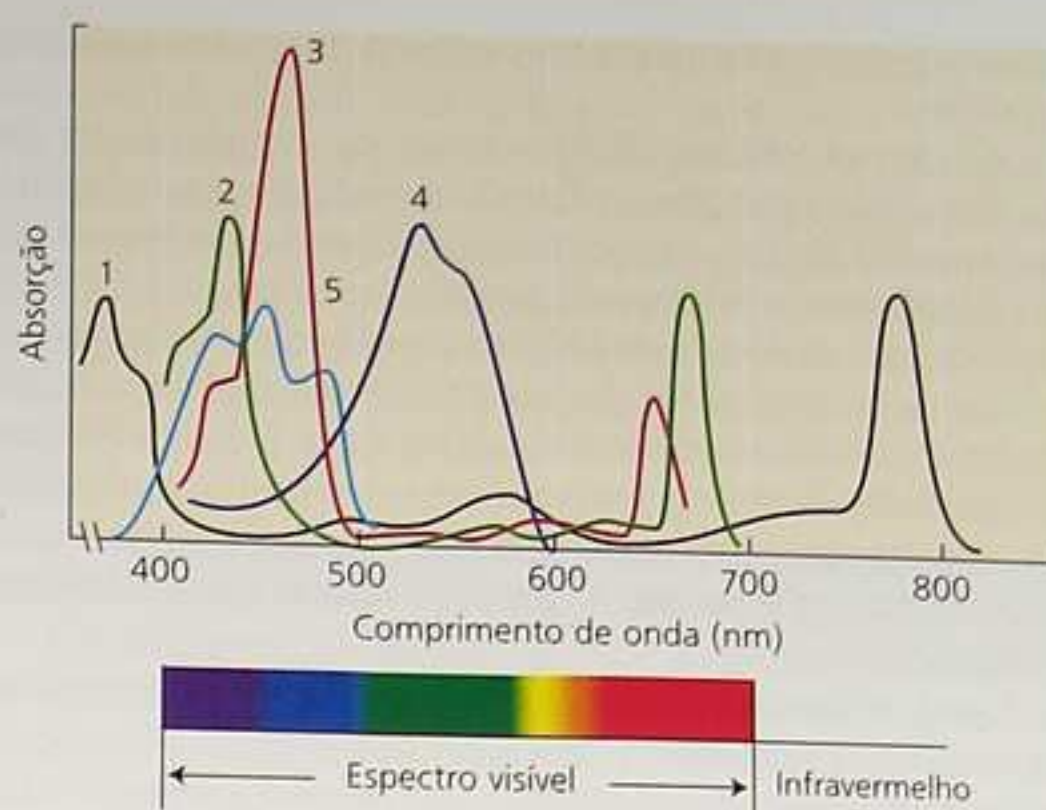
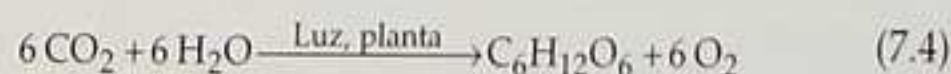



FIGURA 7.7 Espectro de absorção de alguns pigmentos fotossintetizantes. Curva 1, bacterioclorofila *a*; curva 2, clorofila *a*; curva 3, clorofila *b*; curva 4, ficoeritrobilina; curva 5, β-caroteno. Os espectros de absorção mostrados são para pigmentos puros dissolvidos em solventes não-polares, exceto para a curva 4, que representa um tampão aquoso de ficoeritrina, uma proteína das cianobactérias que contém um cromóforo de ficoeritrobilina covalentemente ligado a uma cadeia peptídica. Em muitos casos, os espectros dos pigmentos fotossintéticos *in vivo* são substancialmente afetados pelo ambiente dos pigmentos na membrana fotossintetizante (Avers, 1985).

EXPERIMENTOS-CHAVE PARA A COMPREENSÃO DA FOTOSSÍNTESE

Foram necessárias várias centenas de anos, além da contribuição de muitos cientistas para o estabelecimento da equação química geral da fotossíntese (referências para o desenvolvimento histórico podem ser encontradas na página da Internet). Em 1771, Joseph Priestley observou que um pequeno ramo de menta, crescendo no ar onde uma vela havia apagado, melhorou aquele ar, de forma que outra vela podia acender. Ele descobrira a liberação de oxigênio pelas plantas. O holandês Jan Ingenhousz, em 1779, documentou o papel essencial da luz na fotossíntese.

Outros cientistas estabeleceram os papéis do CO_2 e da H_2O e mostraram que a matéria orgânica, especificamente os carboidratos, são um produto da fotossíntese, junto com o oxigênio. Ao final do século XIX, a reação química geral (em equilíbrio) para a fotossíntese podia ser escrita da seguinte forma:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O \xrightarrow{\text{Luz, planta}} C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \qquad (7.4)$$

onde $C_6H_{12}O_6$ representa um açúcar simples, tal como a glicose. Como se poderá ver no Capítulo 8, a glicose não é o produto das reações de carboxilação. No entanto, em termos energéticos, os açúcares produzidos são aproximadamente os mesmos que a glicose, de modo que a representação de uma glicose na Equação

7.4 deve ser vista como uma conveniência, mas não considerada literalmente.

As reações químicas da fotossíntese são complexas. De fato, pelo menos 50 etapas intermediárias da reação já foram identificadas e, sem dúvida, passos adicionais ainda serão descobertos. Uma idéia inicial sobre a natureza do processo químico essencial da fotossíntese veio na década de 1920 de investigações realizadas com bactérias fotossintetizantes que não produzem oxigênio como produto final. De seus estudos com essas bactérias, C.B. van Niel concluiu que a fotossíntese é um processo redox (redução-oxidação). Essa conclusão foi confirmada e serviu como um conceito fundamental no qual se basearam todas as pesquisas subseqüentes sobre fotossíntese.

Agora, voltaremos à relação entre a atividade fotossintética e o espectro da luz absorvida. Serão discutidos alguns dos experimentos críticos que contribuíram para o conhecimento atual da fotossíntese e consideradas as equações das reações químicas essenciais da fotossíntese.

FIGURA 7.8 Espectro de ação comparado com um espectro de absorção. O espectro de absorção é medido conforme mostra a Figura 7.4. Um espectro de ação é medido plotando-se uma resposta à luz, tal como a liberação de oxigênio, como uma função do comprimento de onda. Se o pigmento usado para obter o espectro de absorção é o mesmo que aqueles que causam a resposta, os espectros de absorção e de ação vão coincidir. No exemplo mostrado aqui, o espectro de ação para a liberação de oxigênio coincide bastante com o espectro de absorção de cloroplastos intactos, indicando que a absorção de luz pelas clorofilas regula a liberação de oxigênio. Algumas discrepâncias são encontradas na região de absorção pelos carotenóides, de 450 a 550 nm, indicando que a transferência de energia dos carotenóides para as clorofilas não é tão efetiva quanto a transferência de energia entre as clorofilas.

O espectro de ação relaciona a absorção de luz à atividade fotossintética

O uso de espectros de ação tem sido central ao desenvolvimento de nosso conhecimento atual sobre a fotossíntese. Um **espectro de ação** mostra a magnitude da resposta de um sistema biológico à luz, em função do comprimento de onda. Um espectro de ação para fotossíntese pode ser construído a partir de medições da liberação de oxigênio em diferentes comprimentos de onda (Figura 7.8), por exemplo. Com freqüência, um espectro de ação pode identificar o cromóforo (pigmento) responsável por um fenômeno particular induzido pela luz.

Alguns dos primeiros espectros de ação foram medidos por T. W. Engelmann no final do século XIX (Figura 7.9), que utilizou um prisma para dispersar a luz solar em um arco-íris, a qual incidia sobre um filamento de alga aquático. Uma população de bactérias dependentes de oxigênio era introduzida no sistema. As bactérias reuniam-se nas regiões dos filamentos que liberavam a maior quantidade de O_2. Essas eram as regiões iluminadas por luz azul e vermelha, as quais são fortemente absorvidas pelas clorofilas. Hoje em dia, espectros de ação podem ser medidos em espectrógrafos do tamanho de uma sala, onde enormes monocromadores banham as amostras em luz monocromática. Mas o princípio é o mesmo dos experimentos de Engelmann.

FIGURA 7.9 Diagrama esquemático das medições do espectro de ação por T.W. Engelmann. Engelmann projetou um espectro de luz sobre os cloroplastos espirais da alga verde filamentosa *Spirogyra* e observou que bactérias dependentes de oxigênio introduzidas no sistema se acumulavam na região do espectro onde os pigmentos de clorofila absorviam. Esse espectro de ação forneceu as primeiras indicações sobre a efetividade da luz absorvida pelos pigmentos acessórios no funcionamento da fotossíntese.

Os espectros de ação foram muito importantes na descoberta de dois distintos fotossistemas que operam em organismos fotossintéticos produtores de O_2. Antes de introduzir os dois fotossistemas, contudo, é necessário descrever as antenas de captação de luz e a necessidade energética da fotossíntese.

A fotossíntese acontece em complexos contendo antenas de captação de luz e centros fotoquímicos de reação

Uma porção da energia absorvida pelas clorofilas e carotenóides é eventualmente armazenada como energia química via formação de ligações químicas. Essa conversão de energia de uma forma para outra é um processo complexo que depende da cooperação entre muitas moléculas de pigmentos e um grupo de proteínas de transferência de elétrons.

A maior parte dos pigmentos serve como um **complexo antena**, coletando luz e transferindo a energia para o **complexo dos centros de reação**, onde as reações químicas de oxidação e redução levam ao armazenamento de energia a longo prazo (Figura 7.10). As estruturas moleculares de alguns complexos antena e centros de reação serão discutidas no decorrer deste capítulo.

Como a planta se beneficia da divisão de trabalho entre as antenas e os centros de reação? Mesmo sob alta radiação solar, uma molécula de clorofila absorve apenas uns poucos fótons a cada segundo. Se cada clorofila possuísse um centro de reação completo associado a ela, as enzimas que fazem parte desse sistema estariam inativas na maior parte do tempo, sendo ativadas apenas ocasionalmente pela absorção de um fóton. Entretanto, se muitos pigmentos puderem enviar energia para um centro de reação comum, o sistema permanece ativo por uma grande fração de tempo.

Em 1932, Robert Emerson e William Arnold realizaram um experimento-chave que forneceu a primeira evidência da cooperação de muitas moléculas de clorofila na conversão de energia durante a fotossíntese. Eles forneceram curtos *flashes* (10^{-5} s) de luz a uma suspensão aquosa da alga verde *Chlorella pyrenoidosa* e mediram a quantidade de oxigênio liberado. Os *flashes* eram separados por, aproximadamente, 0,1 s, um período de tempo que Emerson e Arnold determinaram em experimentos anteriores como longo o suficiente para que as etapas enzimáticas do processo fossem completadas antes da chegada do *flash* seguinte. Os pesquisadores variaram a energia dos *flashes* e verificaram que, em condições de alta energia, a produção de oxigênio não aumentava quando era disponibilizado um *flash* mais intenso: o sistema fotossintético estava saturado com luz (Figura 7.11).

Em suas medições da relação entre a produção de oxigênio e a energia do *flash*, Emerson e Arnold surpreenderam-se ao descobrir que, sob condições de saturação luminosa, apenas uma molécula de oxigênio era produzida para cada 2.500 moléculas de clorofila na amostra. Hoje, sabe-se que centenas de pigmentos estão associados a cada centro de reação e que cada centro de reação necessita operar quatro vezes para produzir uma molécula de oxigênio — daí o valor de 2.500 clorofilas por O_2 liberado.

Os centros de reação e a maior parte dos complexos antena são componentes integrais das membranas fotossintéticas. Nos organismos eucariontes fotossintetizantes, tais membranas estão localizadas dentro dos cloroplastos; nos procariontes fotossintetizantes, o sítio da fotossíntese é a membrana plasmática ou as membranas dela derivadas.

O gráfico mostrado na Figura 7.11 permite calcular outro parâmetro importante das reações luminosas da fotossíntese, a produtividade quântica. A **produtividade quântica** da fotossíntese (Φ) é definida como:

$$\Phi = \frac{\text{Número de produtos fotoquímicos}}{\text{Número total de quanta absorvidos}} \qquad (7.5)$$

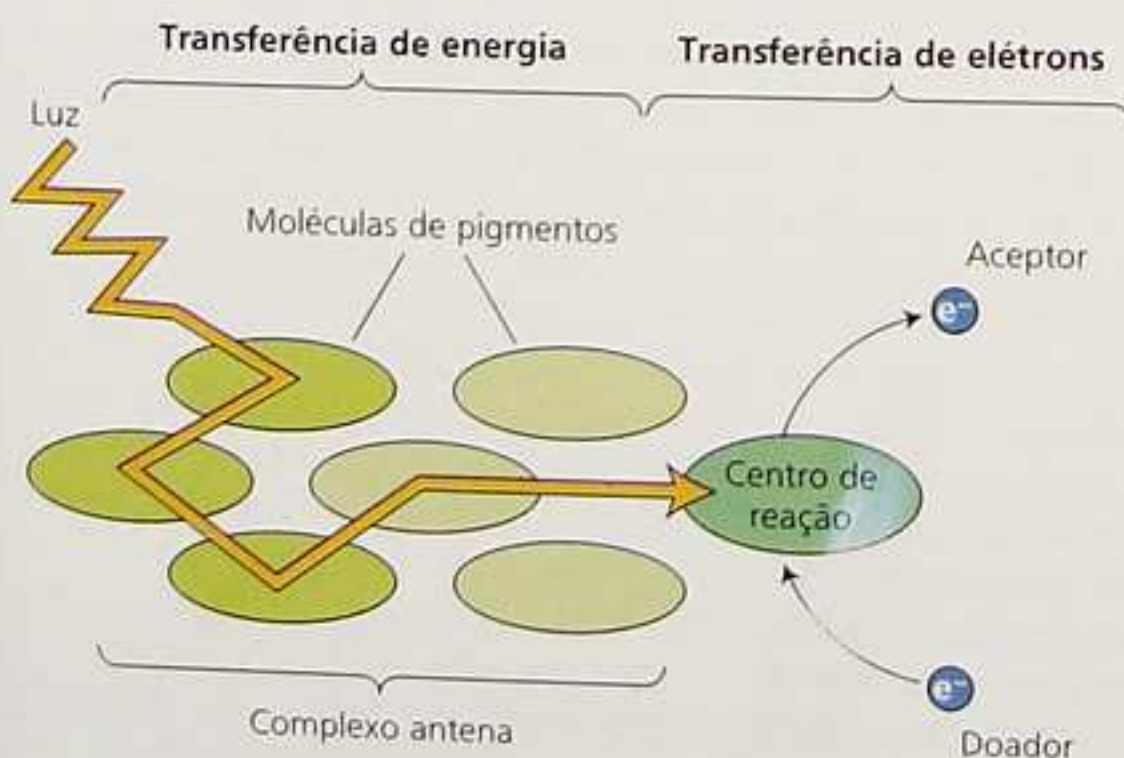



FIGURA 7.10 Esquema conceitual da transferência de energia durante a fotossíntese. Muitos pigmentos juntos servem como uma antena, coletando a luz e transferindo sua energia para o centro de reação, onde as reações químicas armazenam parte dessa energia, transferindo elétrons de um pigmento de clorofila para uma molécula aceptora de elétrons. Um doador de elétrons reduz, então, a clorofila novamente. A transferência de energia na antena é um fenômeno puramente físico e não envolve nenhuma alteração química.

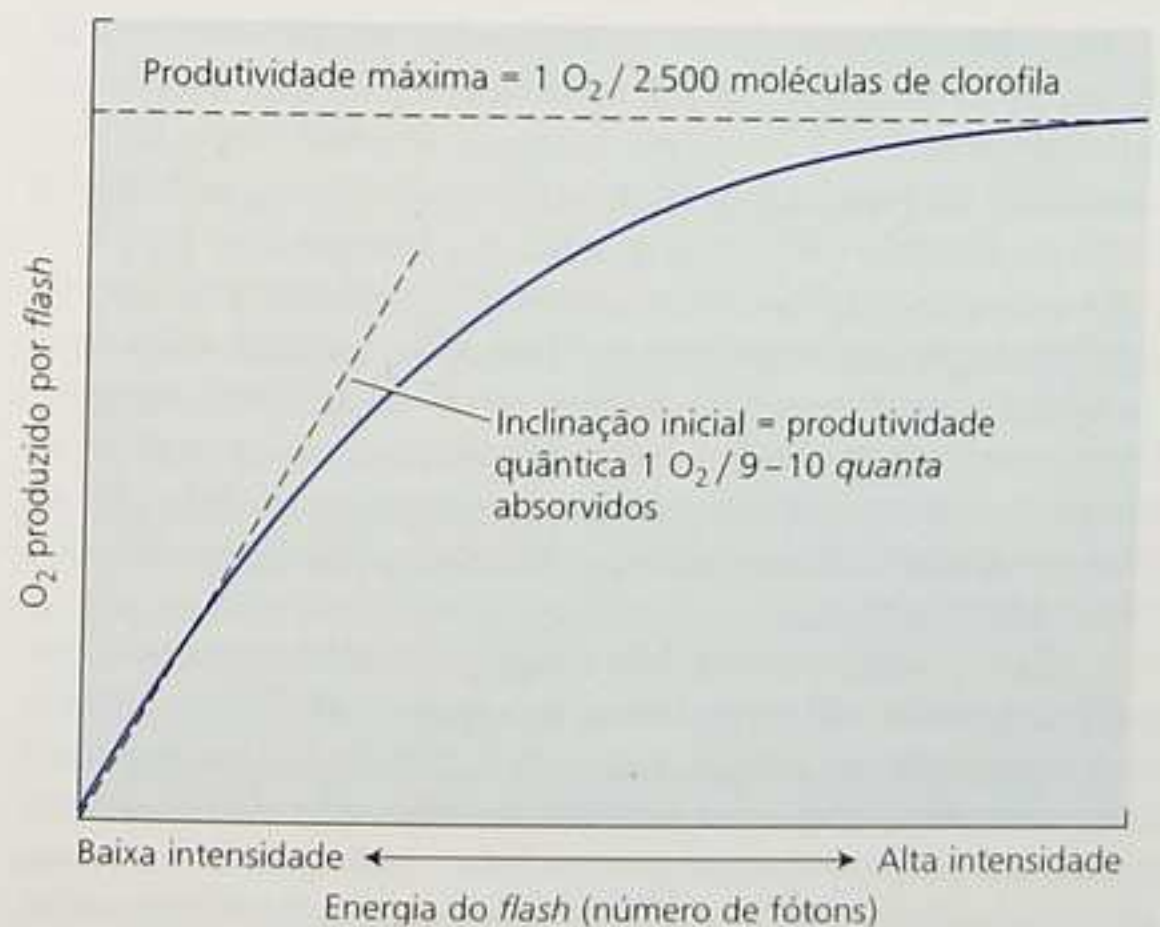



FIGURA 7.11 Relação entre a produção de oxigênio e a energia do *flash*, a primeira evidência da interação entre os pigmentos da antena e o centro de reação. Em condições de saturação de energia, a quantidade máxima de O_2 produzido é uma molécula para cada 2.500 moléculas de clorofila.

Na porção linear (baixa intensidade luminosa) da curva, um aumento no número de fótons provoca um aumento proporcional na liberação de oxigênio. Assim, a inclinação da curva mede a produtividade quântica para a liberação de oxigênio. A produtividade quântica para um processo em particular pode variar de 0 (se o processo não responde à luz) a 1,0 (se cada fóton absorvido contribui para o processo). Uma discussão mais detalhada da produtividade quântica pode ser encontrada no **Tópico 7.3 na Internet**.

Em cloroplastos funcionais mantidos sob fraca iluminação, a produtividade quântica da fotoquímica é de aproximadamente 0,95, a produtividade quântica da fluorescência é 0,05 ou menor e as produtividades quânticas para outros processos são insignificantes. Portanto, a grande maioria das moléculas de clorofila excitadas direciona-se para a fotoquímica.

A reação química da fotossíntese é impulsionada pela luz

É importante considerar que o equilíbrio da reação química mostrada na Equação 7.4 inclina-se fortemente na direção dos reagentes. A constante de equilíbrio para a Equação 7.4, calculada a partir dos valores tabelados de energia livre para a formação de cada composto envolvido, é aproximadamente 10^{-500}. Esse número está tão próximo de zero que se pode ter certeza quase absoluta de que em toda a história do universo nunca uma molécula de glicose foi formada espontaneamente da combinação de H_2O e CO_2 sem o provimento de energia externa. A energia necessária para estimular a reação fotossintética vem da luz. Aqui tem-se uma forma mais simples da Equação 7.4:

$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Luz, planta}} (CH_2O) + O_2 \qquad (7.6)$$

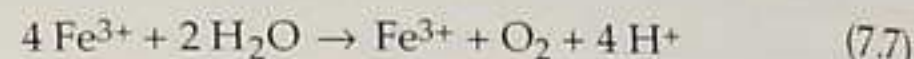
onde (CH_2O) é um sexto de uma molécula de glicose. Aproximadamente nove ou dez fótons de luz, são necessários para estimular a reação da Equação 7.6.

Embora a produtividade quântica fotoquímica sob condições ótimas seja quase 100%, a *eficiência* da conversão da luz em energia química é muito menor. Se luz vermelha de comprimento de onda 680 nm for absorvida, a entrada total de energia (ver Equação 7.2) é aproximadamente 1.760 kJ por mole de oxigênio formado. Essa quantidade de energia é mais do que suficiente para estimular a reação na Equação 7.6, a qual possui uma energia livre para mudança do estado padrão de +467 kJ mol^{-1}. A eficiência da conversão de energia luminosa, sob comprimento de onda ótimo, em energia química é, portanto, de cerca de 27%, que é notavelmente alto para um sistema de conversão de energia. A maior parte dessa energia armazenada é utilizada em processos de manutenção celulares; a quantidade direcionada à formação de biomassa é muito menor (ver Figura 9.2).

Não há conflito entre o fato de que a eficiência quântica fotoquímica (produtividade quântica) seja quase 1 (100%) e a eficiência de conversão de energia seja apenas 27%. A *eficiência quântica* é uma medida da fração dos fótons absorvidos que entram na fotoquímica; a *eficiência energética* é a medida da quantidade de energia dos fótons absorvidos que é armazenada como produtos químicos. Os números indicam que quase todos os fótons absorvidos entram na fotoquímica, porém apenas um quarto da energia em cada fóton é armazenada, o restante é convertido em calor.

A luz estimula a redução do NADP e a formação do ATP

O processo global da fotossíntese é uma reação química redox, na qual elétrons são removidos de uma espécie química, oxidando-a, e adicionados à outra espécie, reduzindo-a. Em 1937, Robert Hill descobriu que, na luz, tilacóides de cloroplastos isolados reduzem uma variedade de compostos, tais como sais de ferro. Tais compostos servem como oxidantes no lugar do CO_2, conforme mostrado na seguinte equação:

$$4\,Fe^{3+} + 2\,H_2O \rightarrow Fe^{3+} + O_2 + 4\,H^+ \qquad (7.7)$$

Muitos compostos têm, desde então, sido demonstrados como receptores artificiais de elétrons no que ficou conhecida como a reação de Hill. Sua utilização tem sido valiosa na elucidação das reações que precedem a redução do carbono.

Hoje, sabe-se que durante o funcionamento normal dos fotossistemas, a luz reduz a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), que, por sua vez, serve com agente redutor para a fixação do carbono no ciclo de Calvin (ver Capítulo 8). O ATP é também formado durante o fluxo de elétrons da água ao NADP e este, também, é utilizado na redução do carbono.

As reações químicas em que a água é oxidada a oxigênio, o NADP é reduzido e o ATP é formado são conhecidas como as *reações dos tilacóides*, pois quase todas, até a redução do NADP, acontecem dentro dos tilacóides. A fixação do carbono e as reações de redução são chamadas de *reações do estroma*, porque as reações de redução do carbono acontecem na região aquosa do cloroplasto, o estroma. Embora essa divisão seja arbitrária, ela é conceitualmente útil.

Os organismos produtores de oxigênio possuem dois fotossistemas que operam em série

No final da década de 1950, vários experimentos confundiam os cientistas que estudavam a fotossíntese. Uma dessas pesquisas, conduzidas por Emerson, media a produtividade quântica da fotossíntese em função do comprimento de onda e revelou um efeito conhecido como a queda no vermelho (Figura 7.12).

Se a produtividade quântica é medida nos comprimentos de onda em que a clorofila absorve luz, os valores encontrados ao longo de quase toda a faixa são bastante constantes, indicando que qualquer fóton absorvido pela clorofila ou outro pigmento é tão efetivo quanto qualquer outro fóton para estimular a fotossíntese. Entretanto, a produtividade cai significativamente na região de absorção da clorofila na faixa do vermelho-distante (acima de 680 nm).

Essa queda não pode ser causada por um decréscimo na absorção da clorofila, pois a produtividade quântica mede apenas a luz que foi efetivamente absorvida. Assim, a luz com comprimentos de onda superiores a 680 nm é muito menos eficiente do que a luz com comprimentos de onda menores.

Um outro resultado experimental enigmático foi o **efeito de intensificação** (do inglês, *enhancement*), também descoberto por Emerson. Ele mediu a taxa de fotossíntese separadamente, com luz de dois comprimentos de onda diferentes, e, a seguir, utilizou os dois fachos de luz simultaneamente (Figura 7.13). Quando luz no vermelho e no vermelho-distante foram fornecidas juntas, surpreendentemente a taxa de fotossíntese foi maior do

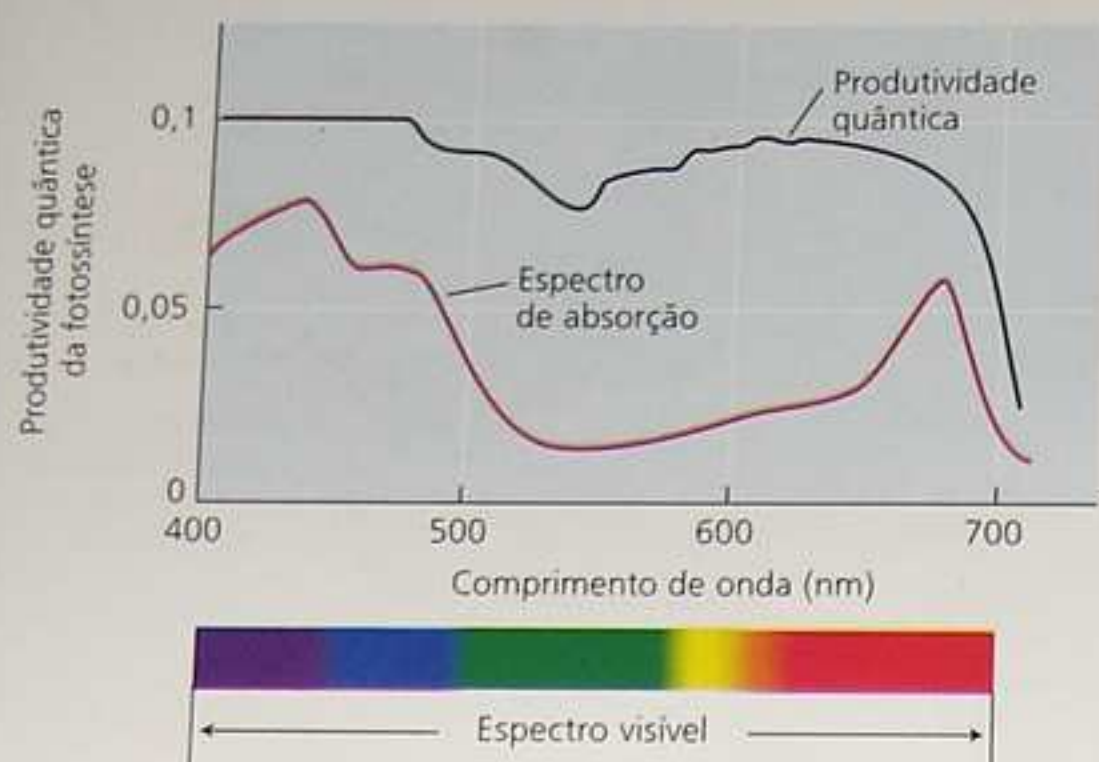



FIGURA 7.12 O efeito de queda no vermelho. A produtividade quântica da fotossíntese (curva negra) cai drasticamente na luz vermelho distante com comprimentos de onda maiores do que 680 nm, indicando que a luz vermelha distante sozinha é ineficiente para induzir a fotossíntese. A pequena queda próximo dos 500 nm reflete a eficiência um pouco menor da fotossíntese utilizando a luz absorvida pelos pigmentos acessórios, carotenóides.

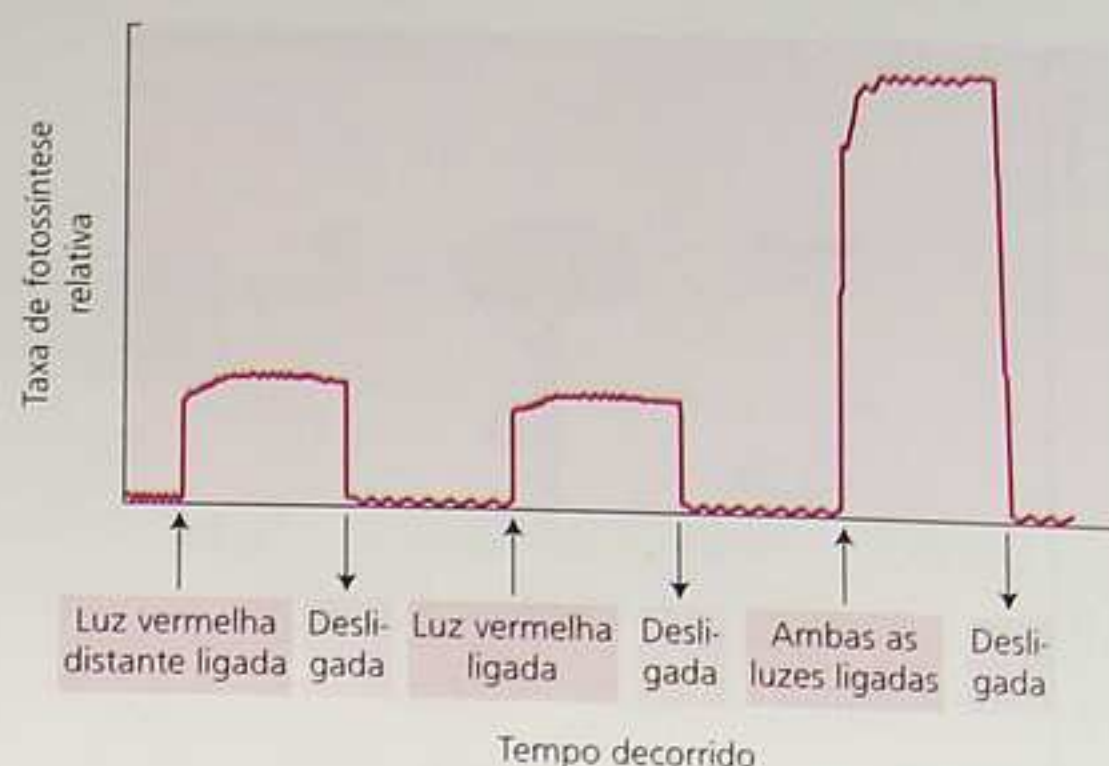



FIGURA 7.13 Efeito de melhora. Quando luz de comprimento de onda no vermelho e vermelho distante é aplicada em conjunto, a taxa de fotossíntese resultante é maior do que a taxa fotossintética para cada um dos comprimentos de onda aplicados separadamente. O efeito de melhora forneceu evidências em favor do conceito de que a fotossíntese é realizada por dois sistemas fotoquímicos trabalhando em conjunto, com uma pequena diferença em seus comprimentos de onda ótimos.

que a soma das taxas com cada um dos comprimentos de onde separadamente.

Tais observações foram eventualmente explicadas por experimentos realizados na década de 1960 (ver **Tópico 7.4 na Internet**), que levaram à descoberta de que dois complexos fotoquímicos, hoje conhecidos como **fotossistemas I** e **II** (**PSI** e **PSII**), operam em série para realizar as reações de armazenamento de energia da fotossíntese.

O fotossistema I absorve preferencialmente luz na faixa do vermelho-distante com comprimentos de onda acima de 680 nm; o fotossistema II absorve preferencialmente luz na faixa do vermelho com comprimento de onda de 680 nm e é muito fracamente estimulado pelo vermelho-distante. Tal dependência de comprimentos de onda explica o efeito de melhora e o efeito de queda no vermelho. Outras diferenças entre os fotossistemas são:

- O fotossistema I produz um redutor forte, capaz de reduzir o $NADP^+$, e um oxidante fraco.
- O fotossistema II produz um oxidante muito forte, capaz de oxidar a água, e um redutor mais fraco do que aquele produzido pelo fotossistema I.

O redutor produzido pelo fotossistema II re-reduz o oxidante produzido pelo fotossistema I. Essas propriedades dos dois fotossistemas são demonstradas esquematicamente na Figura 7.14.

O esquema da fotossíntese mostrado na Figura 7.14, chamado de *esquema Z* (para *ziguezague*), transformou-se na base para a compreensão dos organismos fotossintéticos produtores de oxigênio (oxigênicos). Ele é responsável pela operação de dois fotossistemas física e quimicamente distintos (I e II), cada um com seus próprios pigmentos antena e centros de reação fotoquímicos. Os dois fotossistemas estão ligados por uma cadeia transportadora de elétrons.

ORGANIZAÇÃO DO APARELHO FOTOSSINTÉTICO

Na seção anterior foram explicados alguns dos princípios físicos subjacentes ao processo de fotossíntese, alguns aspectos da funcionalidade dos vários pigmentos e algumas das reações químicas realizadas pelos organismos fotossintetizantes. A atenção estará voltada agora para a arquitetura do aparelho fotossintético e para a estrutura de seus componentes.

O cloroplasto é o local da fotossíntese

Nos eucariontes fotossintetizantes, a fotossíntese acontece na organela subcelular conhecida como cloroplasto. A Figura 7.15 mostra uma eletromicrografia de transmissão de uma seção fina de um cloroplasto de ervilha. O aspecto mais marcante da estrutura do cloroplasto é seu extenso sistema de membranas internas conhecidas como **tilacóides**. Toda a clorofila está contida nesse sistema de membranas, que é o local das reações luminosas da fotossíntese.

As reações de redução do carbono, catalisadas por enzimas hidrossolúveis, têm lugar no **estroma**, a região do cloroplasto fora dos tilacóides. Em sua maioria, os tilacóides, parecem estar intimamente associados uns com os outros. Essas membranas empilhadas são conhecidas como **lamelas granais** (cada pilha individual é chamado de *granum*) e as membranas expostas sem empilhamento são conhecidas como **lamelas estromais**.

Duas membranas separadas, cada uma composta de uma bicamada lipídica e juntas conhecidas como **envoltório**, circun-

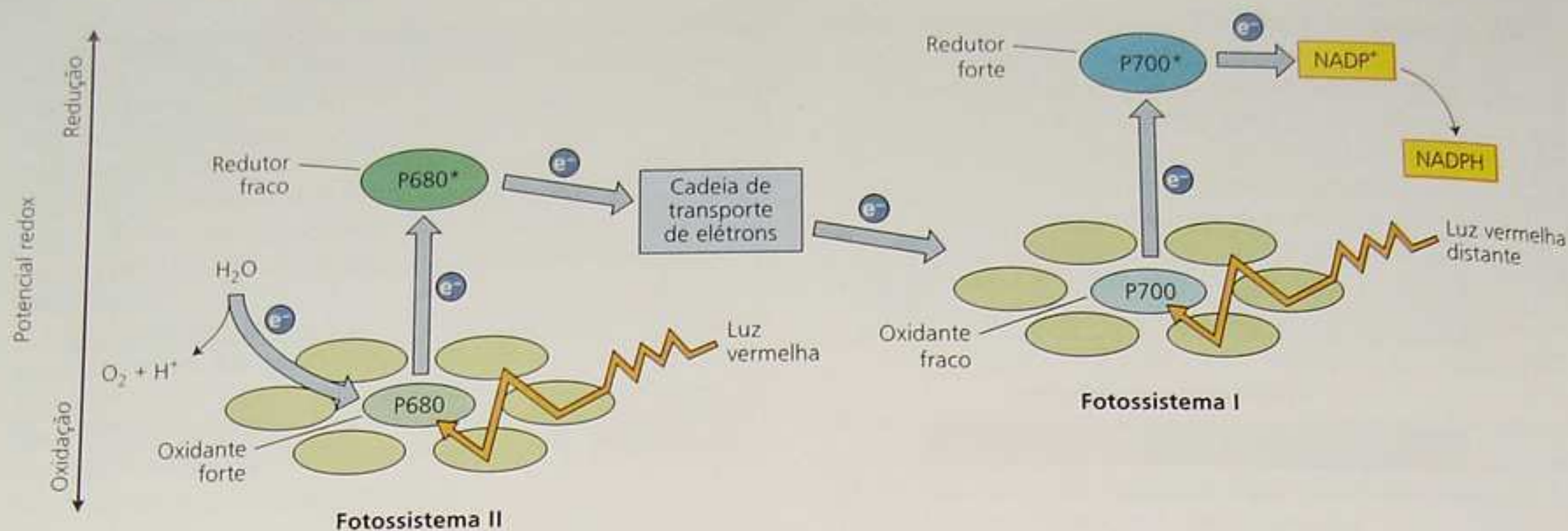



FIGURA 7.14 Esquema Z da fotossíntese. A luz vermelha absorvida pelo fotossistema II (PSII) produz um oxidante forte e um redutor fraco. A luz vermelha distante absorvida pelo fotossistema I (PSI) produz um oxidante fraco e um forte redutor forte. O oxidante forte gerado pelo PSII oxida a água, enquanto o redutor forte produzido pelo PSI reduz o $NADP^+$. Este esquema é básico para a compreensão do transporte de elétrons da fotossíntese. O P680 e o P700 referem-se ao comprimento de onda de máxima absorção das clorofilas do centro de reação no PSII e PSI, respectivamente.

dam a maioria dos tipos de cloroplastos (Figura 7.16). O sistema de membranas duplas contém uma variedade de sistemas de transporte de metabólitos. O cloroplasto também contém seu próprio DNA, RNA e ribossomos. Muitas das proteínas do cloroplasto são produtos da transcrição e tradução dentro do próprio cloroplasto, enquanto outras são codificadas pelo DNA nuclear, sintetizadas nos ribossomos citoplasmáticos e, então, importadas para o interior dos cloroplastos. Essa notável divisão de trabalho, estendendo-se em muitos casos a diferentes subunidades do mesmo complexo enzimático, será discutida mais detalhadamente no decorrer deste capítulo. Para algumas estruturas dinâmicas de cloroplastos, ver o Ensaio 7.1 na Internet.

Os tilacóides contêm proteínas integrais de membrana

Uma grande variedade de proteínas essenciais à fotossíntese estão inseridas nas membranas dos tilacóides. Em muitos casos, porções dessas proteínas estendem-se para as regiões aquosas em ambos os lados dos tilacóides. Essas **proteínas integrais de membrana** contêm uma grande proporção de aminoácidos hidrofóbicos e são, portanto, muito mais estáveis em um meio não-aquoso, tal como a porção de hidrocarbonos da membrana (ver Figura 1.5A).

Os centros de reação, os complexos pigmento-protéicos das antenas e muitas das enzimas do transporte de elétrons são, todos, proteínas integrais de membranas. Nos casos conhecidos, as proteínas integrais de membranas dos cloroplastos possuem uma orientação única dentro da membrana. As proteínas das membranas dos tilacóides possuem uma região apontada

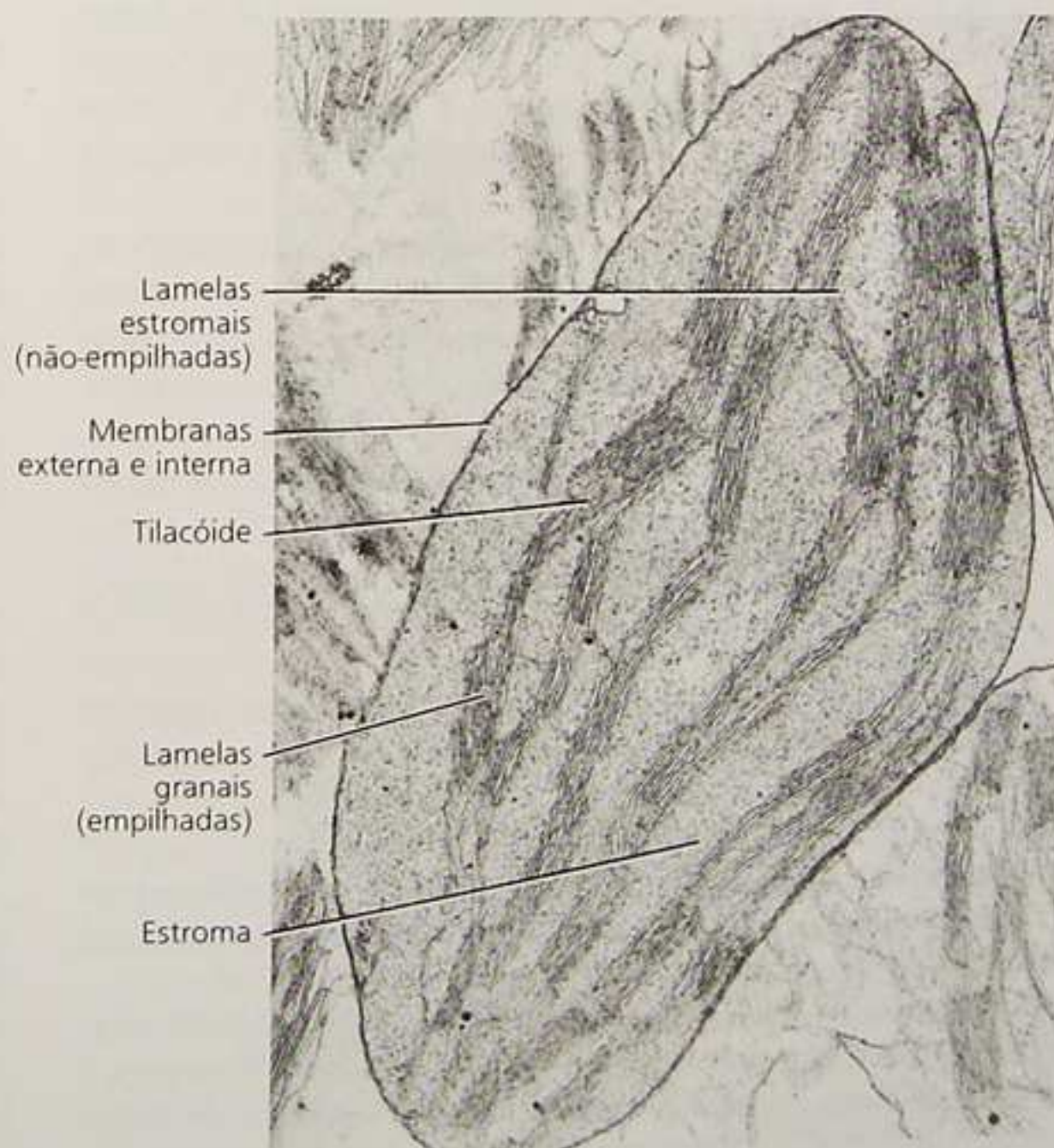



FIGURA 7.15 Eletromicrografia de transmissão de um cloroplasto de ervilha (*Pisum sativum*), fixado em glutaraldeído e OsO_4, incluído em resina plástica e seccionado (secção fina) com um ultramicrotomo (14.500 x) (cedida por J. Swafford).

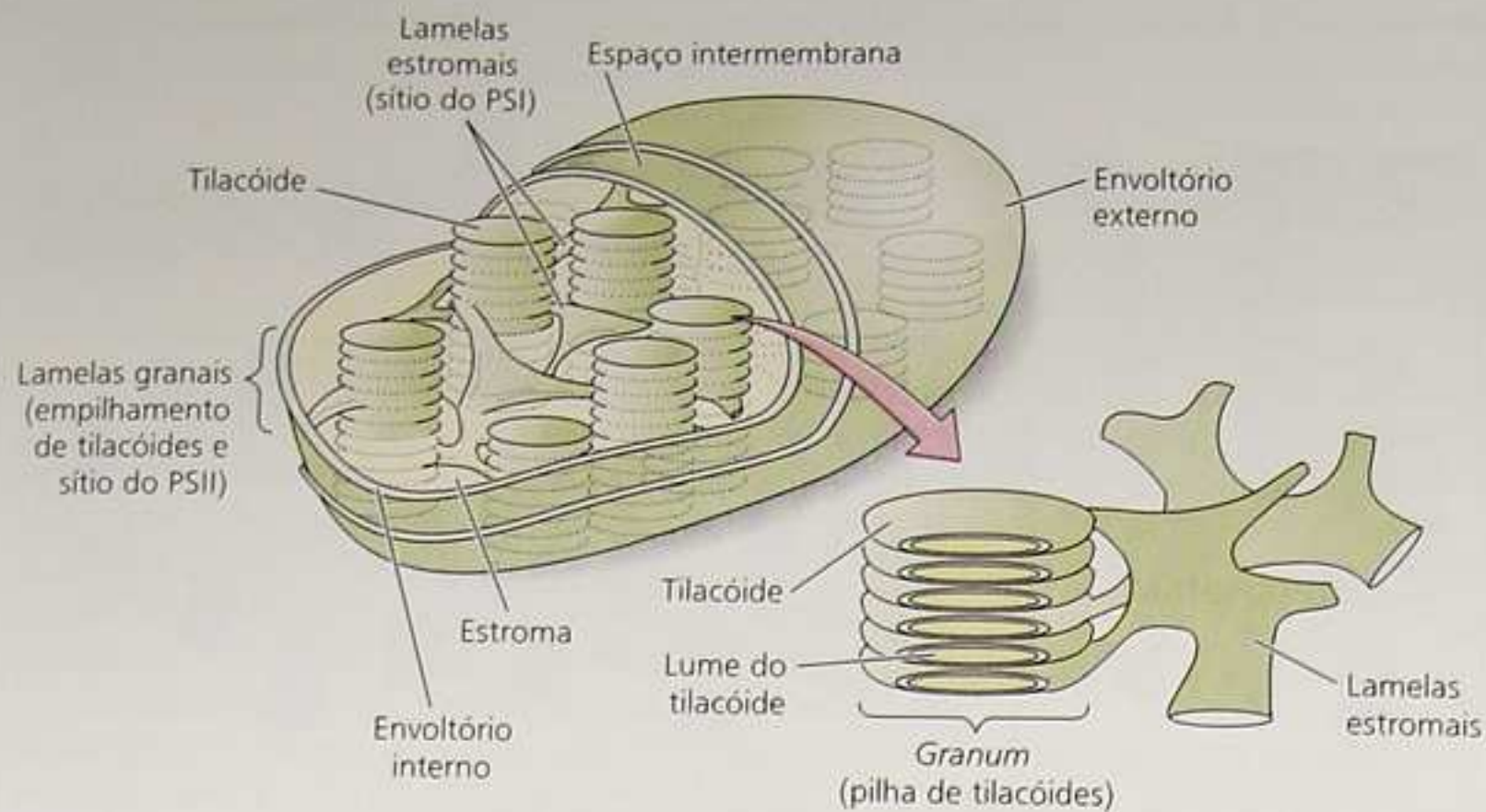



FIGURA 7.16 Desenho esquemático da organização geral das membranas no cloroplasto. O cloroplasto das plantas superiores está circundado por uma membrana externa e outra interna (envoltório). A região do cloroplasto que está dentro da membrana interna e circunda os tilacóides é conhecida como estroma. Ela contém as enzimas que catalisam a fixação do carbono e outras rotas biossintéticas. As membranas dos tilacóides são altamente dobradas e parecem, em muitas imagens, empilhadas como moedas, embora na realidade formem um ou alguns grandes sistemas de membranas interconectadas, com um interior e exterior bem definidos em relação ao estroma. O espaço interno dos tilacóides é conhecido como lume (Becker, 1986).

para o lado estromal da membrana e outra direcionada, a porção do interior do tilacóide, conhecida como *lume* (ver Figuras 7.16 e 7.17).

As clorofilas e os pigmentos acessórios de captação de luz localizados nas membranas dos tilacóides estão sempre associados em ligações não-covalentes, porém de forma altamente específica com as proteínas. Ambas as clorofilas do centro de reação e da antena associam-se às proteínas que estão organizadas no interior das membranas, de modo a otimizar a transferência de energia nos complexos antena e a transferência de elétrons nos centros de reação, ao mesmo tempo minimizando processos de perda.

Os fotossistemas I e II estão separados espacialmente na membrana do tilacóide

O centro de reação PSII, suas clorofilas antena e as proteínas da cadeia de transporte de elétrons associadas estão localizados predominantemente na lamelas granais (Figura 7.18) (Allen e Forsberg, 2001).

O centro de reação PSI, juntamente com seus pigmentos antena e proteínas da cadeia de transporte de elétrons, bem como a enzima conhecida como fator de ligação que catalisa a formação do ATP, são encontrados quase exclusivamente nas lamelas do estroma e nas margens das lamelas granais. O complexo citocromo b_6f da cadeia transportadora de elétrons, que conecta os dois fotossistemas (ver Figura 7.21), está uniformemente distribuído entre estroma e grana.

Assim, ambos os eventos fotoquímicos que têm lugar na fotossíntese oxigênica estão espacialmente separados. Tal separação

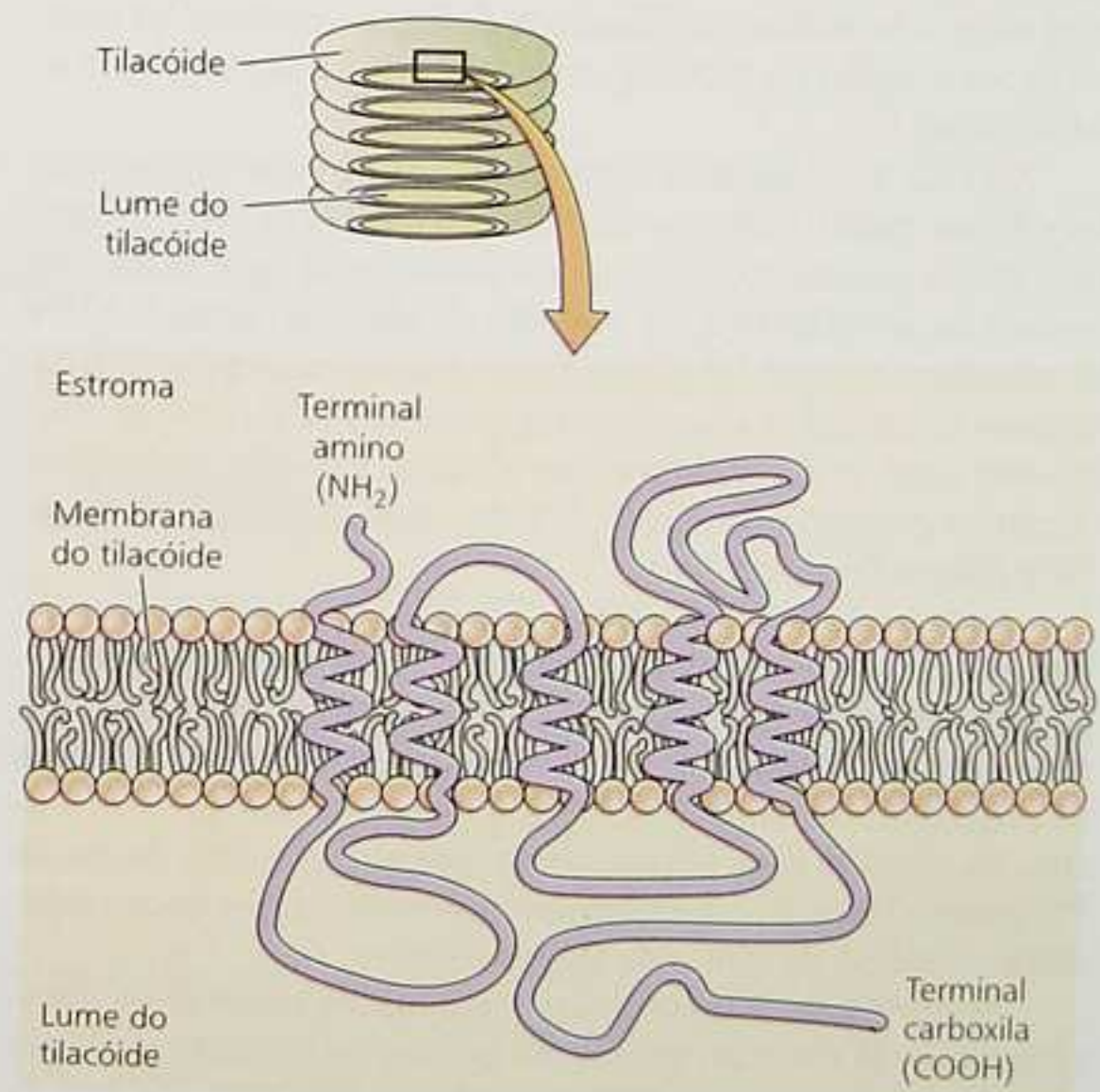



FIGURA 7.17 Padrão estimado de dobramento da proteína D1 do centro de reação PSII. A porção hidrofóbica da membrana é atravessada cinco vezes pela cadeia peptídica rica em resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. A proteína está simetricamente organizada na membrana do tilacóide, com o terminal amino (NH_2) no lado estromal da membrana e o terminal carboxila (COOH) no lado do lume.

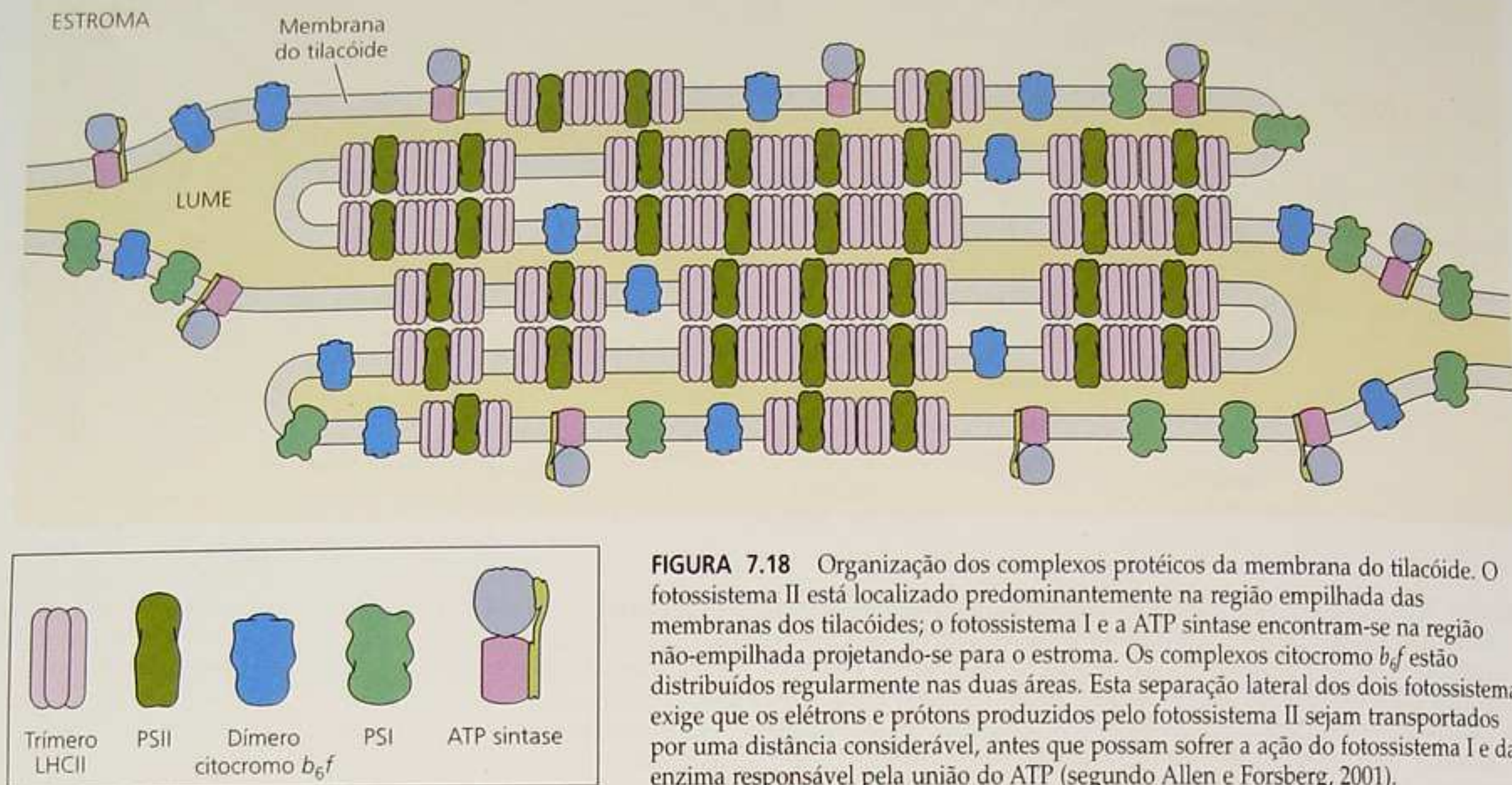



FIGURA 7.18 Organização dos complexos protéicos da membrana do tilacóide. O fotossistema II está localizado predominantemente na região empilhada das membranas dos tilacóides; o fotossistema I e a ATP sintase encontram-se na região não-empilhada projetando-se para o estroma. Os complexos citocromo b_6f estão distribuídos regularmente nas duas áreas. Esta separação lateral dos dois fotossistemas exige que os elétrons e prótons produzidos pelo fotossistema II sejam transportados por uma distância considerável, antes que possam sofrer a ação do fotossistema I e da enzima responsável pela união do ATP (segundo Allen e Forsberg, 2001).

implica que um ou mais dos carreadores de elétrons que funcionam entre os fotossistemas difunda-se da região dos grana da membrana até a região do estroma, onde os elétrons são entregues ao fotossistema I.

No PSII, a oxidação de duas moléculas de água produz quatro elétrons, quatro prótons e uma única molécula de O_2 (ver Equação 7.8). Os prótons produzidos pela oxidação da água devem ser capazes de se difundir para a região do estroma, onde o ATP é sintetizado. O papel funcional dessa grande separação (muitas dezenas de nanômetros) entre os fotossistemas I e II não está inteiramente claro, mas acredita-se que melhore a eficiência de distribuição da energia entre ambos os fotossistemas (Trissl e Wilhelm, 1993; Allen e Forsberg, 2001).

A separação espacial entre os fotossistemas I e II indica que uma estequiometria estrita um-para-um entre os dois fotossistemas não é necessária. Em vez disso, os centros de reação PSII fornecem equivalentes redutores para um *pool* intermediário comum de carreadores solúveis de elétrons (plastoquinona), que será descrito em detalhe mais adiante neste capítulo. O centro de reação PSI remove tais equivalentes desse *pool* comum e não de um específico complexo de centro de reação PSII.

A maioria das medições das quantidades relativas de fotossistemas I e II mostram que há um excesso de fotossistema II nos cloroplastos. Mais comumente, a razão de PSII para PSI está ao redor de 1,5: 1; porém, isto pode ser alterado quando as plantas se desenvolvem sob diferentes condições de luz.

As bactérias anóxicas fotossintetizantes possuem um centro de reação similar ao do fotossistema II

Organismos não-produtores de oxigênio (anóxicos), tais como as bactérias púrpuras fotossintetizantes dos gêneros *Rhodobacter* e *Rhodopseudomonas*, contêm somente um fotossistema. Tais organismos mais simples foram muito úteis para detalhados estudos estruturais e funcionais que contribuíram para uma melhor compreensão da fotossíntese oxigênica.

Hartmut Michel, Johann Deisenhofer, Robert Huber e colaboradores, em Munique, elucidaram a estrutura tridimensional do centro de reação da bactéria púrpura fotossintetizante *Rhodopseudomonas viridis* (Deisenhofer e Michel, 1989). Essa conquista marcante, que recebeu o Prêmio Nobel em 1988, foi a primeira determinação estrutural por raio X de alta resolução de uma proteína integral de membrana e a primeira determinação estrutural para um complexo do centro de reação (ver Figuras 7.5A e 7.5B no **Tópico 7.5 na Internet**). A análise detalhada dessas estruturas, juntamente com a caracterização de inúmeros mutantes, revelou muitos dos princípios envolvidos nos processos de armazenamento de energia realizado pelos centros de reação.

A estrutura do centro de reação das bactérias é considerada similar, sob muitos aspectos, àquela encontrada no fotossistema II de organismos fotossintetizantes produtores de oxigênio, especialmente na porção receptora de elétrons da cadeia. As proteínas que formam o núcleo do centro de reação das bactérias são relati-

vamente similares em seqüência às suas contrapartidas no fotossistema II, implicando um relacionamento evolutivo.

ORGANIZAÇÃO DOS SISTEMAS ANTENA DE ABSORÇÃO DE LUZ

Os sistemas antena das diferentes classes de organismos fotossintetizantes são extraordinariamente variados, em contraste com os centros de reação, que parecem ser similares mesmo entre organismos distantemente relacionados. A variedade de complexos antena reflete a adaptação evolutiva aos diferentes ambientes nos quais os organismos vivem, bem como a necessidade, para alguns organismos, de equilibrar a entrada de energia aos dois fotossistemas (Grossman e cols., 1995; Green e Durnford, 1996).

Os sistemas antena funcionam para enviar energia eficientemente para os centros de reação com os quais estão associados (van Grondelle e cols., 1994; Pullerits e Sundström, 1996). O tamanho do sistema de antena varia consideravelmente em diferentes organismos: de 20 a 30 bacterioclorofilas por centro de reação, em algumas bactérias fotossintéticas; geralmente, 200 a 300 clorofilas por centro de reação, em plantas superiores; alguns milhares de pigmentos por centro de reação, em alguns tipos de algas e bactérias. As estruturas moleculares dos pigmentos antena são também bastante variáveis, embora todas sejam associadas de alguma forma às membranas fotossintéticas.

Acredita-se que o mecanismo físico pelo qual a energia de excitação é transferida da clorofila que absorve a luz ao centro de reação seja a **ressonância**. Por esse mecanismo, a energia de excitação é transferida de uma molécula para outra através de um processo não-radiativo.

Uma boa analogia para a ressonância é a transferência de energia entre dois diapasões. Ao se bater um diapasão e colocá-lo apropriadamente próximo de outro, o segundo recebe parte da energia do primeiro e começa a vibrar. Assim como a transferência de energia nos complexos antena, a eficiência da transferência de energia entre os dois diapasões depende da distância entre eles e de sua orientação relativa, bem como de suas oscilações ou freqüências de vibração.

A transferência de energia nos complexos antena é muito eficiente: aproximadamente 95 a 99% dos fótons absorvidos pelos pigmentos antena têm sua energia transferida para os centros de reação, onde ela pode ser utilizada para a fotoquímica. Há uma importante diferença entre a transferência de energia entre os pigmentos na antena e a transferência de elétrons que ocorre no centro de reação: enquanto a transferência de energia é um fenômeno puramente físico, a de elétrons envolve alterações químicas nas moléculas.

A antena canaliza energia para o centro de reação

A seqüência de pigmentos dentro da antena que canaliza a energia absorvida em direção ao centro de reação possui máximas de absorção, que são progressivamente desviadas em direção aos comprimentos de onda mais longos no vermelho (Figura 7.19). Tal alteração em direção ao vermelho no comprimento de onda de

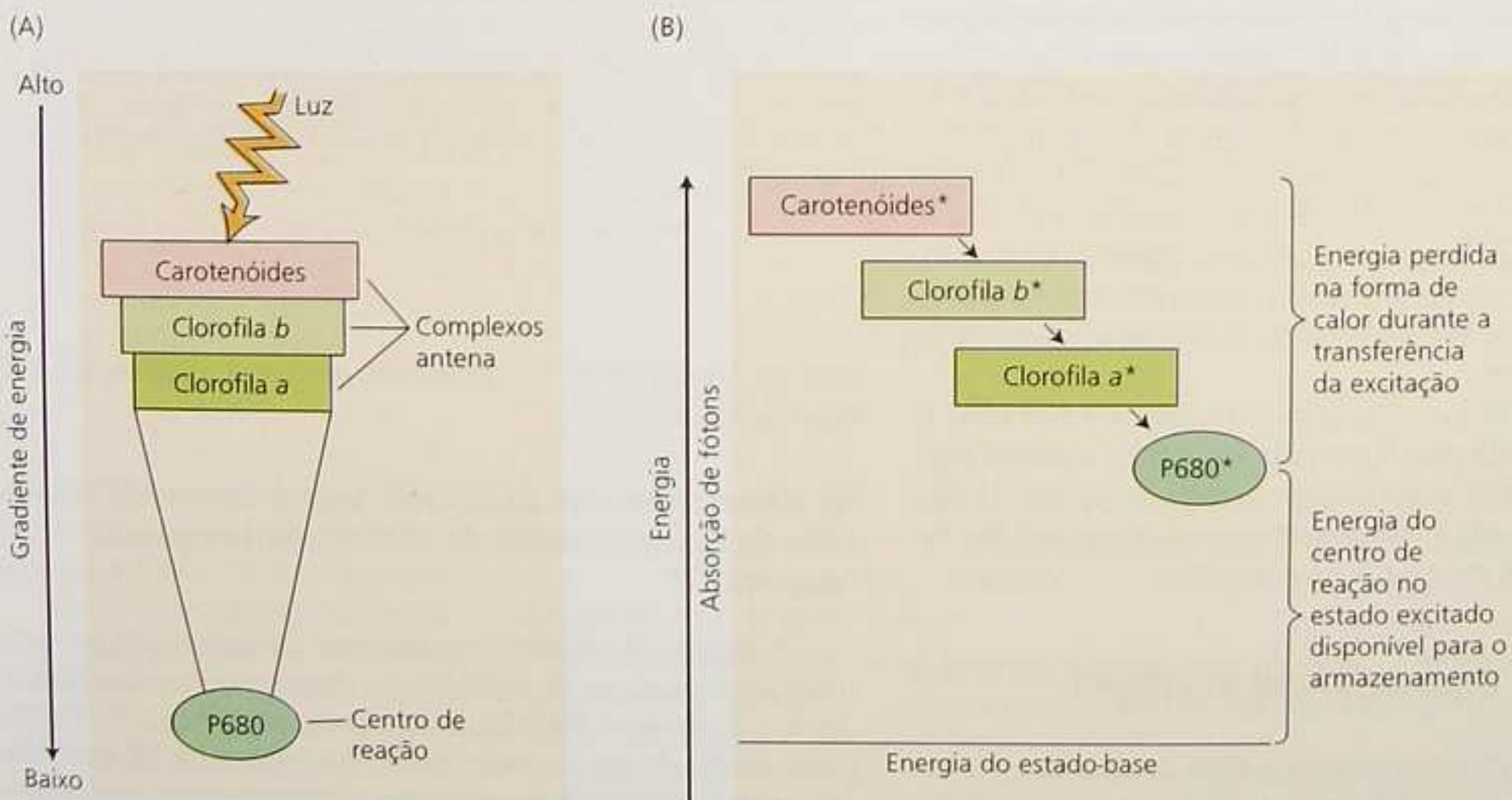



FIGURA 7.19 Canalização da excitação do sistema de antena em direção ao centro de reação. (A) A energia do estado excitado dos pigmentos aumenta com a distância do centro de reação, isto é, os pigmentos mais próximos do centro de reação possuem menor energia do que os pigmentos mais distantes. Esse gradiente de energia faz com que a transferência de excitação em direção ao centro de reação seja energeticamente favorável e a transferência de excitação para as porções periféricas da antena, energeticamente desfavorável. (B) Por esse processo, parte da energia é perdida na forma de calor para o ambiente; porém, sob condições ótimas, a quase totalidade das excitações recebidas pelos complexos antena pode ser transferida para o centro de reação. Os asteriscos denotam o estado de excitação.

máxima absorção significa que a energia do estado excitado é menor próximo ao centro de reação do que na periferia do sistema antena.

Como resultado desse arranjo, quando a excitação é transferida, por exemplo, de uma molécula de clorofila *b* com uma absorção máxima a 650 nm para uma molécula de clorofila *a* com uma absorção máxima a 670 nm, a diferença em energia entre as duas clorofilas excitadas é perdida para o ambiente na forma de calor.

Para que a energia de excitação seja transferida de volta à clorofila *b*, a energia perdida como calor teria que ser devolvida. A probabilidade de transferência reversa é, portanto, menor, simplesmente porque a energia térmica não é suficiente para suprir o déficit entre pigmentos de baixa e alta energia. Esse efeito dá ao processo de apreensão de energia um grau de direcionalidade ou irreversibilidade e torna a entrega da energia ao centro de reação mais eficiente. Em essência, o sistema sacrifica parte da energia de cada *quantum*, de forma que quase todos os *quanta* possam ser aprisionados pelo centro de reação.

Muitos complexos antena possuem um motivo estrutural comum

Em todos os organismos eucariontes que contêm as clorofilas *a* e *b*, as proteínas de antena mais abundantes são membros de uma grande família de proteínas estruturalmente relacionadas. Algumas delas são associadas primariamente ao fotossistema II e chamadas proteínas do **complexo de captação de luz II (LHCII**; do inglês, *light-harvesting complex II*); outras são associadas ao fotossistema I e chamadas proteínas *LHCI*. Tais complexos antena são também conhecidos como **proteínas antena clorofilas *a*/*b*** (Paulsen, 1995; Green e Durnford, 1996).

A estrutura de uma das proteínas LHCII foi determinada por uma combinação de microscopia e cristalografia eletrônicas (Figura 7.20) (Kühlbrandt e cols., 1994). A proteína contém três regiões α-hélice e liga aproximadamente 15 moléculas de clorofila *a* e *b*, bem como alguns carotenóides. Somente alguns desses pigmentos podem ser vistos na estrutura definida. A estrutura das proteínas LHCI ainda não foi determinada, mas é provavelmente similar à das proteínas do LHCII. Todas essas proteínas possuem uma similaridade de seqüência significativa e são quase certamente descendentes de uma proteína ancestral comum (Grossman e cols., 1995; Green e Durnford, 1996).

A luz absorvida por carotenóides ou clorofila *b* nos LHC é rapidamente transferida para a clorofila *a* e, então, a outros pigmentos antena intimamente associados ao centro de reação. O complexo LHCII também está envolvido em processos reguladores, os quais serão discutidos mais tarde neste capítulo.

FIGURA 7.20 Vista bidimensional da estrutura do complexo antena LHCII das plantas superiores, determinada por uma combinação de eletromicroscopia e eletrocristalografia. Assim como a cristalografia de raios X, a eletrocristalografia utiliza os padrões de difração de baixa energia dos elétrons para identificar estruturas macromoleculares. O complexo antena é um pigmento protéico transmembrana, com três regiões helicoidais que atravessam a porção apolar da membrana. Aproximadamente 15 moléculas de clorofilas *a* e *b* estão associadas ao complexo, bem como vários carotenóides. As posições de várias das clorofilas são mostradas na ilustração e dois carotenóides formam um X no meio do complexo. Na membrana, o complexo é trimérico e agrega-se ao redor da periferia do centro de reação PSII (segundo Kühlbrandt e cols., 1994).

MECANISMOS DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

Parte das evidências que levaram à idéia de duas reações fotoquímicas operando em série já foi discutida neste capítulo. Aqui serão considerados em detalhe as reações químicas envolvidas na transferência de elétrons durante a fotossíntese. Discutir-se-á a excitação da clorofila pela luz e a redução do primeiro aceptor de elétrons, o fluxo de elétrons através dos fotossistemas II e I, a oxidação da água como a fonte primária de elétrons e a redução do aceptor final de elétrons ($NADP^+$). O mecanismo quimiosmótico que medeia a síntese de ATP será discutido em detalhe mais adiante no capítulo (ver "Transporte de prótons e a síntese de ATP nos cloroplastos").

Os elétrons ejetados da clorofila viajam através de uma série de transportadores de elétrons organizados no "esquema Z"

A Figura 7.21 mostra a versão atual do esquema Z, no qual todos os carreadores de elétrons que atuam no fluxo de elétrons desde a água até o NADP+ estão organizados verticalmente no ponto médio de seu potencial redox (ver **Tópico 7.6 na Internet**, para mais detalhes). Os componentes que sabidamente reagem entre si estão conectados por setas, de modo que o esquema Z é, na verdade, uma síntese tanto da informação cinética quanto da termodinâmica. As grandes setas verticais representam a entrada de energia luminosa no sistema.

Os fótons excitam os centros de reação (P680 para o PSII e P700 para o PSI) e um elétron é ejetado. O elétron passa, então, por uma série de carreadores e, eventualmente, reduz o P700 (para os

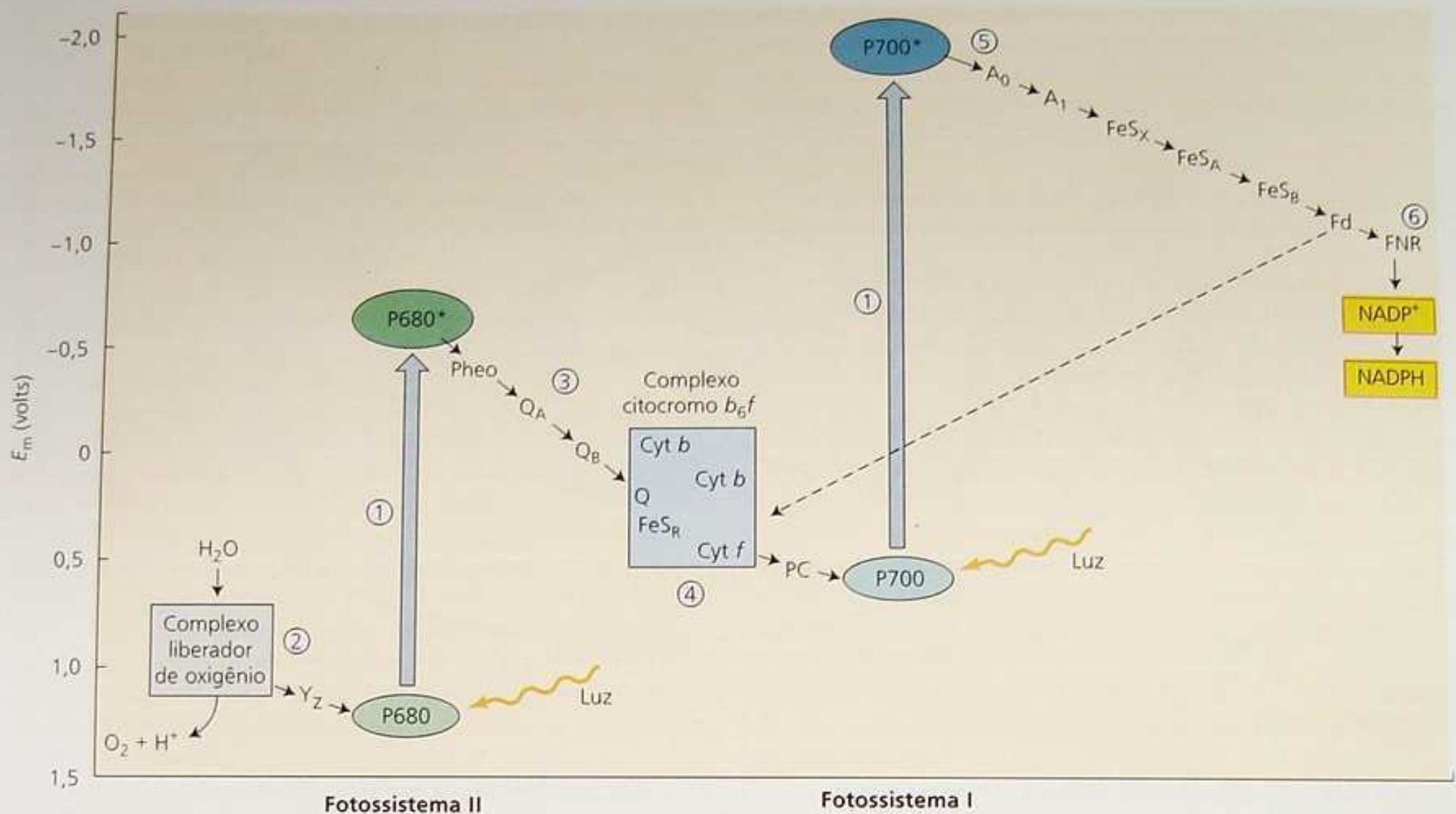



FIGURA 7.21 Detalhamento do esquema Z para organismos fotossintetizantes produtores de O_2. Os carreadores redox estão posicionados no ponto médio de seu potencial redox (em pH 7). (1) As setas verticais representam a absorção de fótons pelas clorofilas do centro de reação: P680 para o fotossistema II (PSII) e P700 para o fotossistema I (PSI). A clorofila do centro de reação PSII excitada, P680*, transfere um elétron para a feofitina (Pheo). (2) No lado oxidante do PSII (à esquerda da seta que une o P680 ao P680*), o P680 oxidado pela luz é re-reduzido pelo Y_z, que recebeu elétrons via oxidação da água. (3) No lado redutor do PSII (à direita da seta que une o P680 ao P680*), a feofitina transfere elétrons para os aceptores Q_A e Q_B, que são plastoquinonas. (4) O complexo citocromo b_6f transfere elétrons para a plastocianina (PC), uma proteína solúvel, que, por sua vez, reduz o $P700^+$ (P700 oxidado). (5) Acredita-se que o aceptor de elétrons do P700* (A_0) seja uma clorofila e o aceptor seguinte (A_1), uma quinona. Uma série de proteínas ferro-sulfurosas ligadas à membrana (FeS_X, FeS_A, e FeS_B) transfere elétrons para uma ferredoxina solúvel (Fd). (6) A flavoproteína solúvel ferredoxina-NADP redutase (FNR) reduz o $NADP^+$ a NADPH, o qual é utilizado no ciclo de Calvin para reduzir o CO_2 (ver Capítulo 8). A linha tracejada indica o fluxo cíclico de elétrons ao redor do PSI (segundo Blakenship e Prince, 1985).

elétrons vindos do PSII) ou $NADP^+$ (para os elétrons vindos do PSI). Muito da discussão que segue descreve a jornada desses elétrons e a natureza de seus carreadores.

Quase todos os processos químicos que perfazem as reações luminosas da fotossíntese são realizados por quatro principais complexos protéicos: fotossistema II, o complexo citocromo b_6f, fotossistema I e a ATP sintase. Esses quatro complexos integrais de membrana estão vetorialmente orientados na membrana dos tilacóides para funcionar da seguinte forma (Figura 7.22):

- O fotossistema II oxida a água a O_2 no lume do tilacóide e durante esse processo libera prótons no lume.
- O citocromo b_6f recebe elétrons do PSII e os envia ao PSI. Ele também transporta prótons adicionais do estroma para o lume.
- O fotossistema I reduz o $NADP^+$ a NADPH no estroma pela ação da ferredoxina (Fd) e da flavoproteína ferredoxina-NADP redutase (FNR).
- A ATP sintase produz ATP na medida em que prótons atravessam seu canal central de volta ao estroma provenientes do lume.

A energia é capturada quando uma clorofila excitada reduz uma molécula aceptora de elétrons

Conforme já foi discutido, a função da luz é excitar uma clorofila especializada no centro de reação, por absorção direta ou, mais freqüentemente, via transferência de energia de um pigmento antena. Tal processo de excitação pode ser visualizado como a promoção de um elétron do orbital completo de mais elevado nível de energia da clorofila ao orbital incompleto de menor energia (Figura 7.23). O elétron no orbital superior está apenas fracamente ligado à clorofila e é facilmente perdido, se uma molécula capaz de aceitá-lo está por perto.

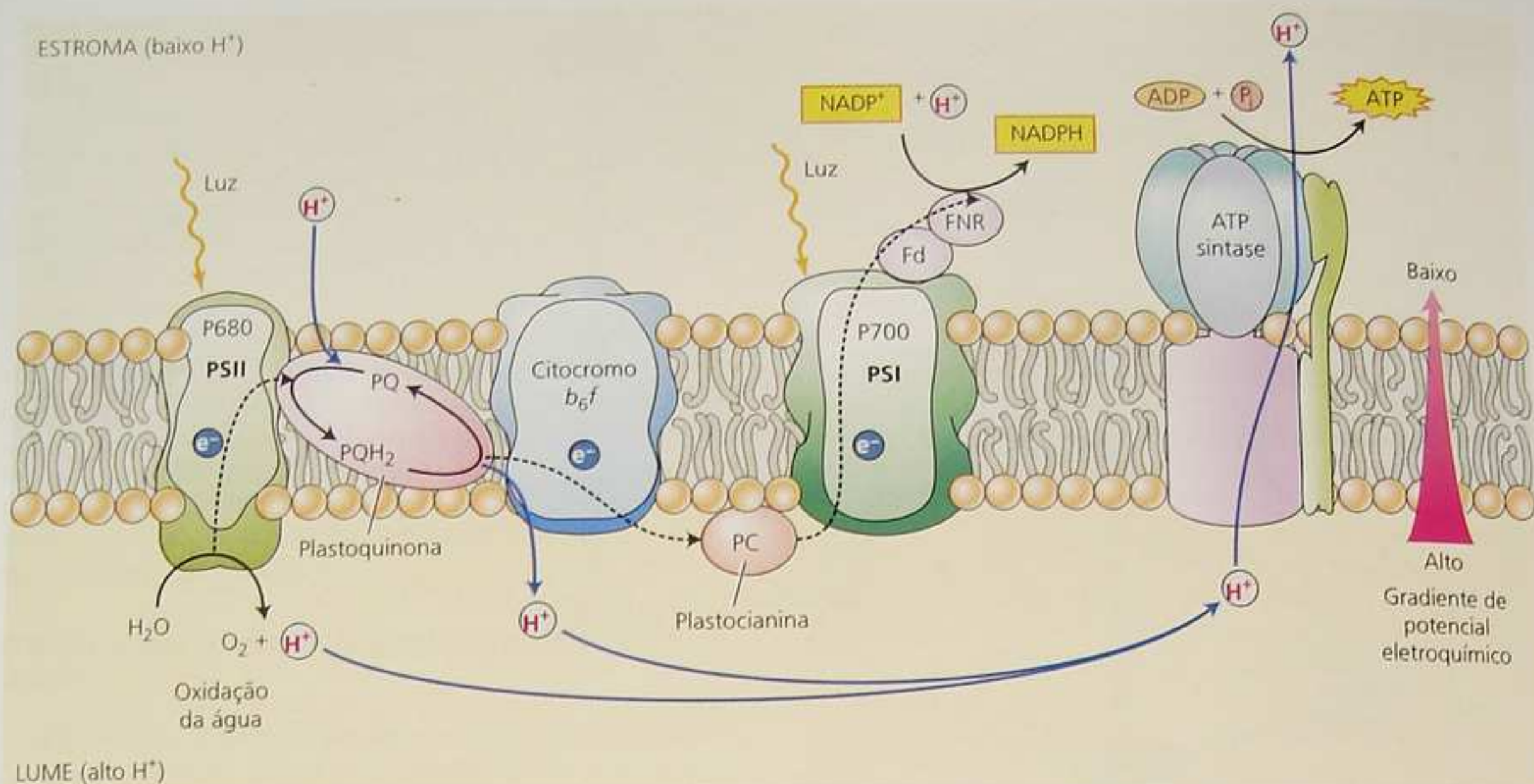



FIGURA 7.22 A transferência de elétrons e prótons na membrana do tilacóide é feita vetorialmente por quatro complexos protéicos. A água é oxidada e os prótons são liberados no lume pelo PSII. O PSI reduz o $NADP^+$ a NADPH no estroma, por meio da ferredoxina (Fd) e da flavoproteína ferredoxina-NADP redutase (FNR). Os prótons são também transportados para o lume pelo complexo citocromo b_6f e contribuem para o gradiente eletroquímico. Tais prótons necessitam, então, difundir-se até a enzima ATP sintase, onde sua difusão através do gradiente de potencial eletroquímico será utilizada para sintetizar ATP no estroma. A plastoquinona reduzida (PQH_2) e a plastocianina transferem elétrons para o citocromo b_6f e para o PSI, respectivamente. As linhas tracejadas representam a transferência de elétrons; as linhas sólidas representam o movimento de prótons.

A primeira reação que converte a energia do elétron em energia química — isto é, o primeiro evento fotoquímico — é a transferência de um elétron do estado excitado de uma clorofila no centro de reação para uma molécula aceptora. Uma forma equivalente de visualizar o processo é que o fóton absorvido provoca um rearranjo eletrônico na clorofila do centro de reação, seguido por um processo de transferência de elétrons em que parte da energia do fóton é capturada na forma de energia redox.

Imediatamente após o evento fotoquímico, a clorofila do centro de reação está em um estado oxidado (deficiente em elétrons ou positivamente carregada) e a molécula receptora de elétrons mais próxima é reduzida (rica em elétrons ou negativamente carregada). O sistema está agora em uma junção crítica. O orbital de baixa energia da clorofila do centro de reação oxidado e positivamente carregado mostrado na Figura 7.23 tem uma vaga e pode aceitar um elétron. Se a molécula aceptora doa seu elétron de volta para a clorofila do centro de reação, o sistema retornará ao estado existente antes da excitação pela luz e toda a energia absorvida será convertida em calor.

Entretanto, este processo de *recombinação* pouco produtivo não parece ocorrer de forma substancial em centros de reação funcionais. Em vez disso, o aceptor transfere seu elétron extra para um aceptor secundário e este para outro dentro da cadeia transportadora de elétrons. O centro de reação oxidado da clorofila que havia doado um elétron é re-reduzido por um doador secundário, o qual, por sua vez, é reduzido por um doador terciário. Nas plan-

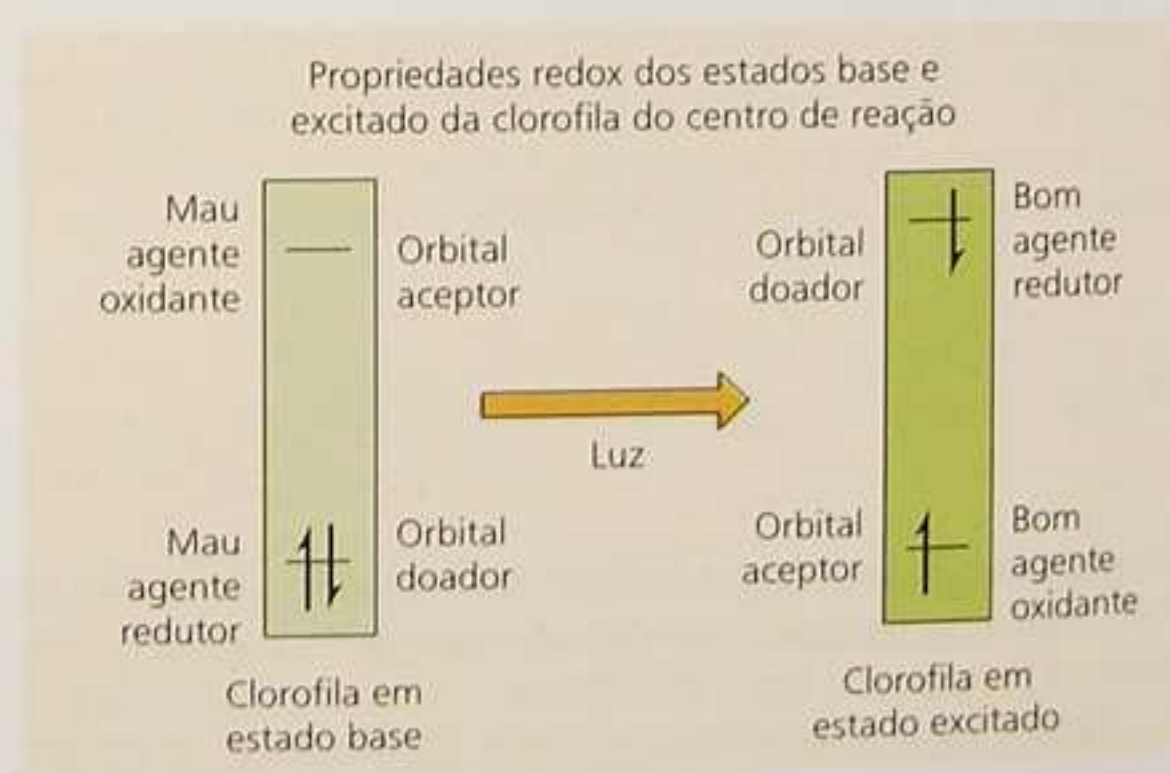



FIGURA 7.23 Diagrama de ocupação orbital para os estados-base e excitado da clorofila do centro de reação. No estado-base, a molécula é um mau agente redutor (perde elétrons de um orbital de baixa energia) e um mau agente oxidante (aceita elétrons somente em orbitais de alta energia). No estado excitado, a situação é inversa e um elétron pode ser perdido do orbital de alta energia, tornando a molécula um poderoso agente redutor. Essa é a razão para potencial redox do estado excitado, mostrado para o P680* e P700* na Figura 7.21, ser extremamente negativo. O estado excitado pode também agir como um oxidante forte, aceitando elétrons em um orbital de baixa energia, embora esta rota não seja significativa para os centros de reação (segundo Blankenship e Prince, 1985).

tas, o principal doador de elétrons é H_2O e o principal aceptor, o NADP+ (ver Figura 7.21).

A essência do armazenamento de energia fotossintética é, então, a transferência inicial de um elétron de uma clorofila excitada para uma molécula aceptora, seguida por uma série muito rápida de reações químicas secundárias que separam as cargas positivas e negativas. Estas reações secundárias separam as cargas para lados opostos da membrana dos tilacóides em aproximadamente 200 picossegundos (1 picossegundo = 10^{-12} s).

Com as cargas assim separadas, a reação reversa é muitas ordens de magnitude mais lenta e a energia foi capturada. Cada transferência secundária de elétrons é acompanhada pela perda de alguma energia, tornando, assim, o processo efetivamente irreversível. A produtividade quântica medida para a produção de produtos estáveis em centros de reação purificados de bactérias fotossintetizantes foi 1.0; isto significa que cada fóton produz produtos estáveis e não ocorrem reações reversas.

Embora esses tipos de medições não tenham sido realizados em centros de reação purificados de plantas superiores, as exigências quânticas para a liberação de O_2 sob condições ótimas (luz de baixa intensidade) indicam que os valores para os eventos fotoquímicos primários são muito próximos de 1.0. A estrutura do centro de reação parece ser extremamente bem sintonizada para taxas máximas de reações produtivas e taxas mínimas de reações que desperdicem energia.

As clorofilas dos centros de reação dos dois fotossistemas absorvem em comprimentos de onda diferentes

Conforme foi discutido neste capítulo, PSI e PSII possuem características de absorção distintas. As medições precisas das máximas de absorção foram possíveis por meio das alterações ópticas nas clorofilas dos centros de reação nos estados reduzidos e oxidados. A clorofila do centro de reação está de forma transiente em um estado oxidado após a perda de um elétron e antes de ser reduzida pelo seu doador de elétrons.

No estado oxidado, a forte absorbância de luz na região do vermelho do espectro, que é característica de clorofilas, é perdida ou sofre **descoloração** (do inglês, *bleached*). Portanto, é possível monitorar o estado redox dessas clorofilas por medições ópticas de absorbância em tempo real, em que tal descoloração é monitorada diretamente (ver **Tópico 7.1 na Internet**).

Utilizando essas técnicas, Bessel Kok verificou que a clorofila do centro de reação do fotossistema I absorve maximamente a 700 nm no seu estado reduzido. Por isso, esta clorofila é chamada **P700** (o P significa *pigmento*). H. T. Witt e colaboradores encontraram o transiente óptico análogo do fotossistema II a 680 nm, de forma que a clorofila de seu centro de reação é conhecida como **P680**. Anteriormente, Louis Duysens identificou a bacterioclorofila do centro de reação da bactéra púrpura fotossintetizante como **P870**.

A estrutura em raio X do centro de reação bacteriano (ver Figuras 7.5.A e 7.5.B no **Tópico 7.5 na Internet**) claramente indica que o P870 é um par ou dímero de bacterioclorofilas intimamente ligadas, em vez de uma única molécula. O doador primário do fotossistema I, P700, é um dímero de moléculas de clorofila *a*. O fotossistema II também contém um dímero de clorofilas, embora o doador primário, P680, possa não residir inteiramente nesses pigmentos. No estado oxidado, as clorofilas do centro de reação contêm um elétron não-pareado. As moléculas com elétrons não-pareados podem ser comumente detectadas por técnica de ressonância magnética conhecida como **ressonância de spin eletrônico** (ESR, do inglês *electron spin ressonance*). Estudos de ESR, juntamente com as medições espectroscópicas já descritas, levaram à descoberta de muitos dos carreadores intermediários de elétrons no sistema fotossintético de transporte de elétrons.

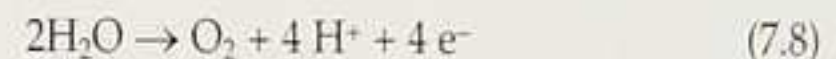
O centro de reação do fotossistema II é um complexo pigmento-protéico com múltiplas subunidades

O fotossistema II está contido em um supercomplexo protéico com múltiplas subunidades (Figura 7.24) (Barber e cols., 1999). Nas plantas superiores, esse supercomplexo protéico com múltiplas subunidades possui dois centros de reação completos e alguns complexos antena. O núcleo do centro de reação consiste de duas proteínas de membrana conhecidas como D1 e D2, bem como outras proteínas, como mostra a Figura 7.25 (Zouni e cols., 2001).

A clorofila doadora primária (P680), clorofilas adicionais, carotenóides, feofitinas e plastoquinonas (dois aceptores de elétrons descritos na próxima seção) estão ligados às proteínas de membrana D1 e D2, as quais possuem alguma similaridade de seqüência com os peptídeos L e M da bactéria púrpura. Outras proteínas servem como complexos antena ou estão envolvidas na liberação do oxigênio. Alguns, como o citocromo b_{559}, não têm função conhecida, mas podem estar envolvidos em um ciclo de proteção ao redor do fotossistema II.

A água é oxidada a oxigênio pelo fotossistema II

A água é oxidada de acordo com a seguinte reação química (Hoganson e Babcock, 1997):

$$2H_2O \rightarrow O_2 + 4\,H^+ + 4\,e^- \qquad (7.8)$$

Esta equação indica que quatro elétrons são removidos de duas moléculas de água, gerando uma molécula de oxigênio e quatro íons de hidrogênio (para mais detalhes sobre as reações de oxidação-redução, ver Capítulo 2 na página e no **Tópico 7.6 na Internet**).

A água é uma molécula muito estável. A oxidação da água para formar oxigênio molecular é muito difícil e o complexo fotossintético de liberação de oxigênio é o único sistema bioquímico conhecido que realiza tal reação. A liberação fotossintética é também a fonte de quase todo o oxigênio na atmosfera terrestre.

O mecanismo químico da oxidação fotossintética da água ainda não é conhecido, embora muitos estudos tenham fornecido uma quantidade substancial de informação sobre o processo (ver **Tópico 7.7 na Internet** e Figura 7.26). Os prótons produzidos pela oxidação da água são liberados dentro do lume do tilacóide e não diretamente no compartimento estromal (ver Figura 7.22), devido à natureza vetorial da membrana e ao fato de o complexo produtor de oxigênio estar localizado na superfície interna do tilacóide. Esses prótons são, por fim, transferidos do lume para o estroma por translocação pela ATP sintase. Assim, os prótons liberados durante a oxidação da água contribuem para o potencial eletroquímico que irá operar na formação do ATP.

Sabe-se já há alguns anos que o manganês (Mn) é um co-fator essencial no processo de oxidação da água (ver Capítulo 5) e uma hipótese clássica na pesquisa sobre fotossíntese postula que íons Mn sofrem uma série de oxidações — conhecidas como *estados* S e rotuladas S_0, S_1, S_2, S_3 e S_4 (ver **Tópico 7.7 na Internet**) — possivelmente ligadas à oxidação da água e à geração de O_2 (ver Figu-

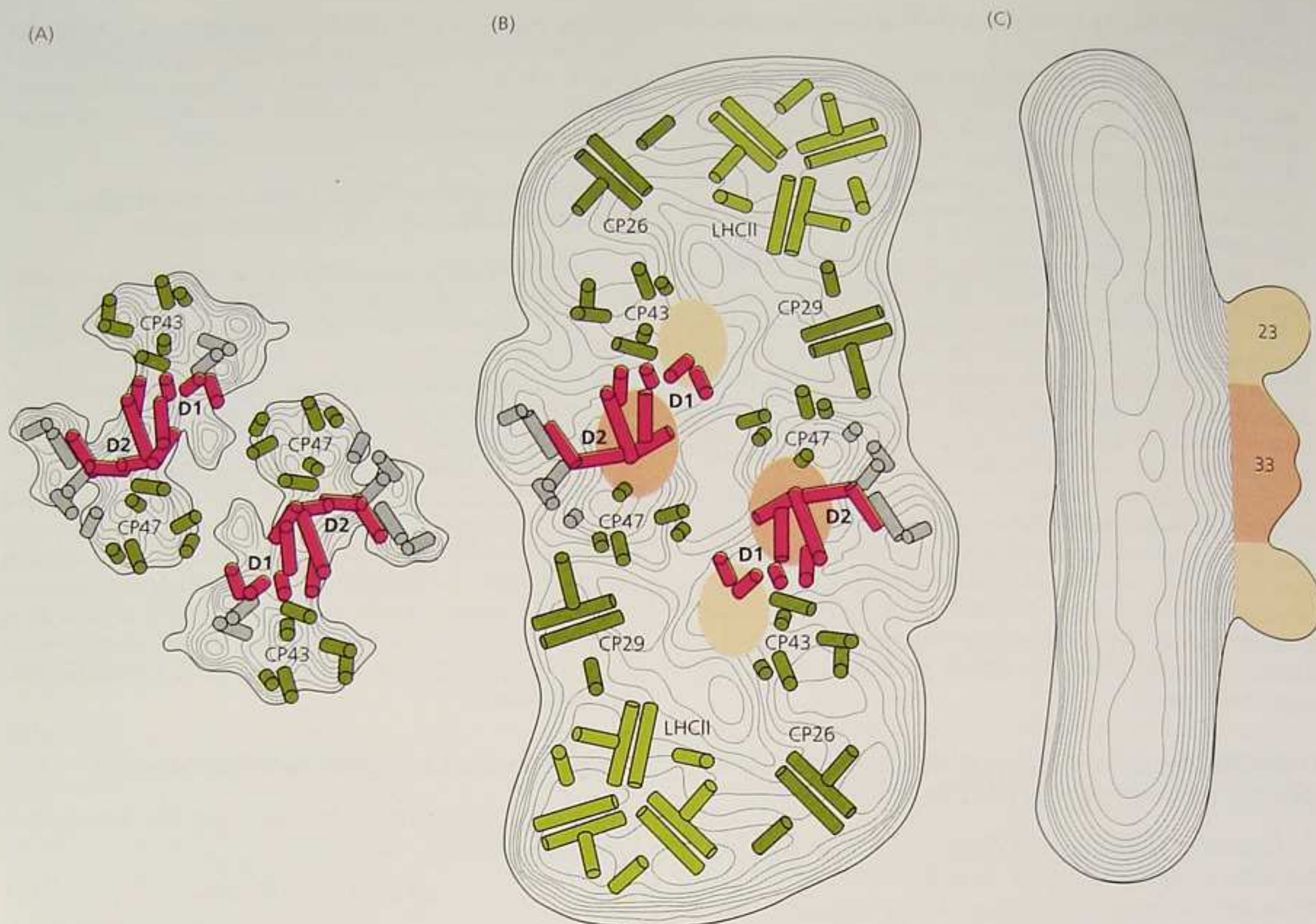



FIGURA 7.24 Estrutura do supercomplexo protéico dimérico com múltiplas subunidades do fotossistema II das plantas superiores, determinada por microscopia eletrônica. A figura mostra dois centros de reação completos, sendo cada um deles um complexo dimérico. (A) Arranjo helicoidal das subunidades núcleo D1 e D2 (vermelho) e CP43 e CP47 (verde). (B) Vista do lado do lume do supercomplexo, incluindo complexos antena adicionais, LHCII, CP26 e CP29, e o complexo extrínseco de liberação do oxigênio, mostrados nos círculos laranja e amarelo. Hélices desconhecidas são mostradas em cinza. (C) Vista lateral do complexo, ilustrando o arranjo das proteínas extrínsecas do complexo de liberação de oxigênio (segundo Barber et al., 1999).

ra 7.26). Essa hipótese tem recebido forte suporte de uma variedade de experimentos, mais notadamente de estudos de absorção de raios X e ESR, ambos detectando o manganês diretamente (Yachandra e cols., 1996). Experimentos analíticos indicam que quatro íons Mn estão associados com cada complexo de liberação de oxigênio. Outros experimentos mostram que íons Cl^- e Ca^{2+} são essenciais para a liberação de O_2 (ver Figura 7.26 e **Tópico 7.7 na Internet**).

Um transportador de elétrons, geralmente identificado como Y_z, funciona entre o complexo de liberação de oxigênio e o P680 (ver Figuras 7.21 e 7.26). Para funcionar nessa região, Yz necessita de uma forte tendência para reter os seus elétrons. Esta espécie foi identificada como um radical formado de um resíduo de tirosina na proteína D1 do centro de reação do PSII.

Uma feofitina e duas quinonas captam elétrons do fotossistema II

Evidências de estudos espectrais e de ESR indicam que a feofitina atua como um aceptor primário no fotossistema II, seguido por um complexo de duas plastoquinonas situadas muito próximas a um átomo de ferro. A **feofitina** é uma clorofila na qual o átomo central de magnésio foi substituído por dois átomos de hidrogênio. Essa alteração química concede à feofitina propriedades químicas e espectrais ligeiramente diferentes das características da clorofila. O arranjo preciso dos transportadores no complexo aceptor de elétrons não é conhecido, mas provavelmente assemelha-se muito àquele do centro de reação da bactéria púrpura (para mais detalhes, ver a Figura 7.5.B no **Tópico 7.5 na Internet**).

FIGURA 7.25 Estrutura do centro de reação do fotossistema II da cianobactéria *Synechococcus elongatus*, magnificado de 3,8. A estrutura inclui as proteínas núcleo do centro de reação D1 e D2 as proteínas antena CP43 e CP47, os citocromos b_{559} e c_{550}, a proteína extrínseca de 33 kDa liberadora de oxigênio PsbO, além dos pigmentos e outros co-fatores. Sete hélices não-identificadas são mostradas em cinza. (A) Vista da superfície lumenal, perpendicular ao plano da membrana. (B) Vista lateral paralela ao plano da membrana (segundo Zouni e cols., 2001).

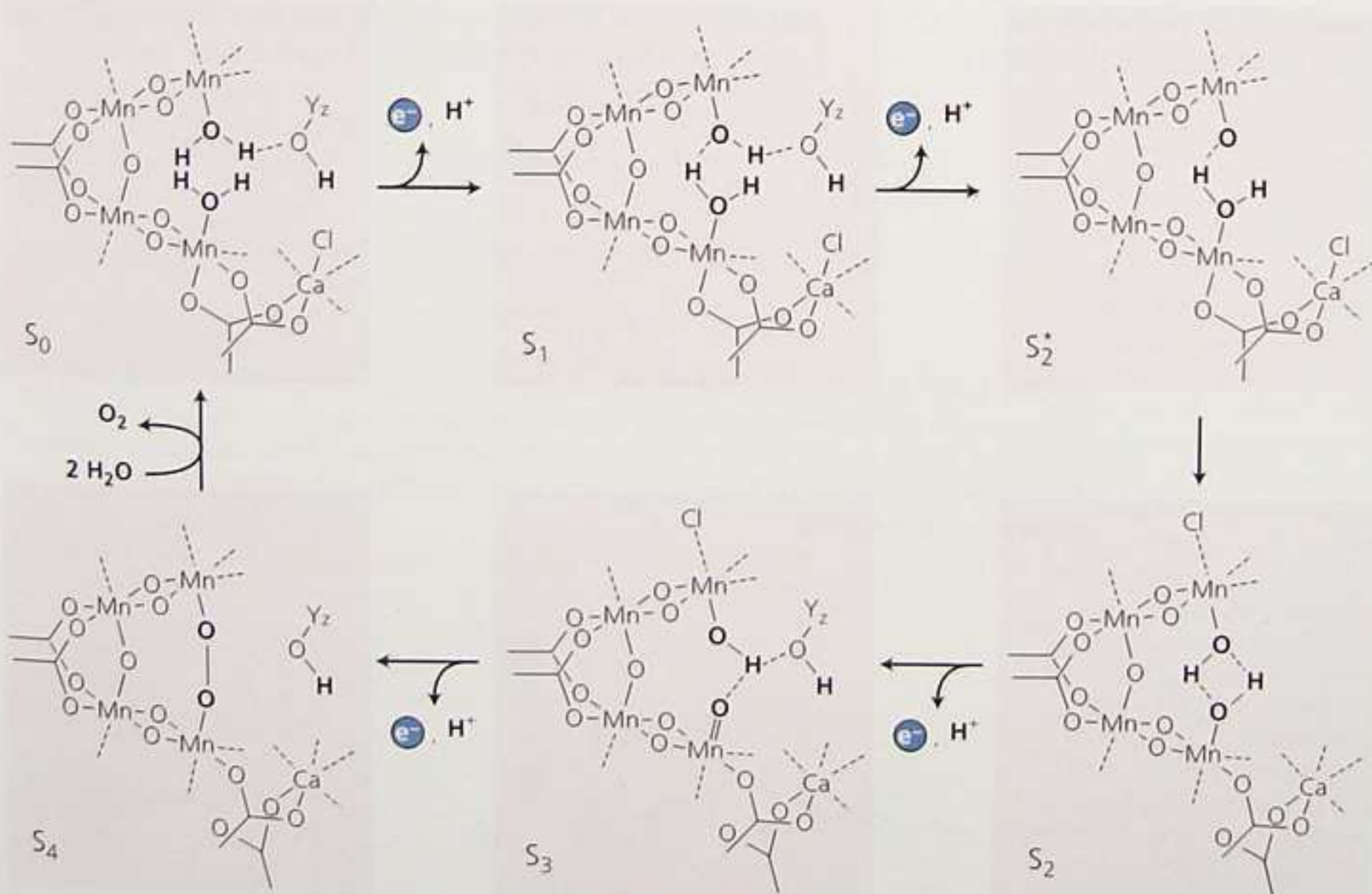
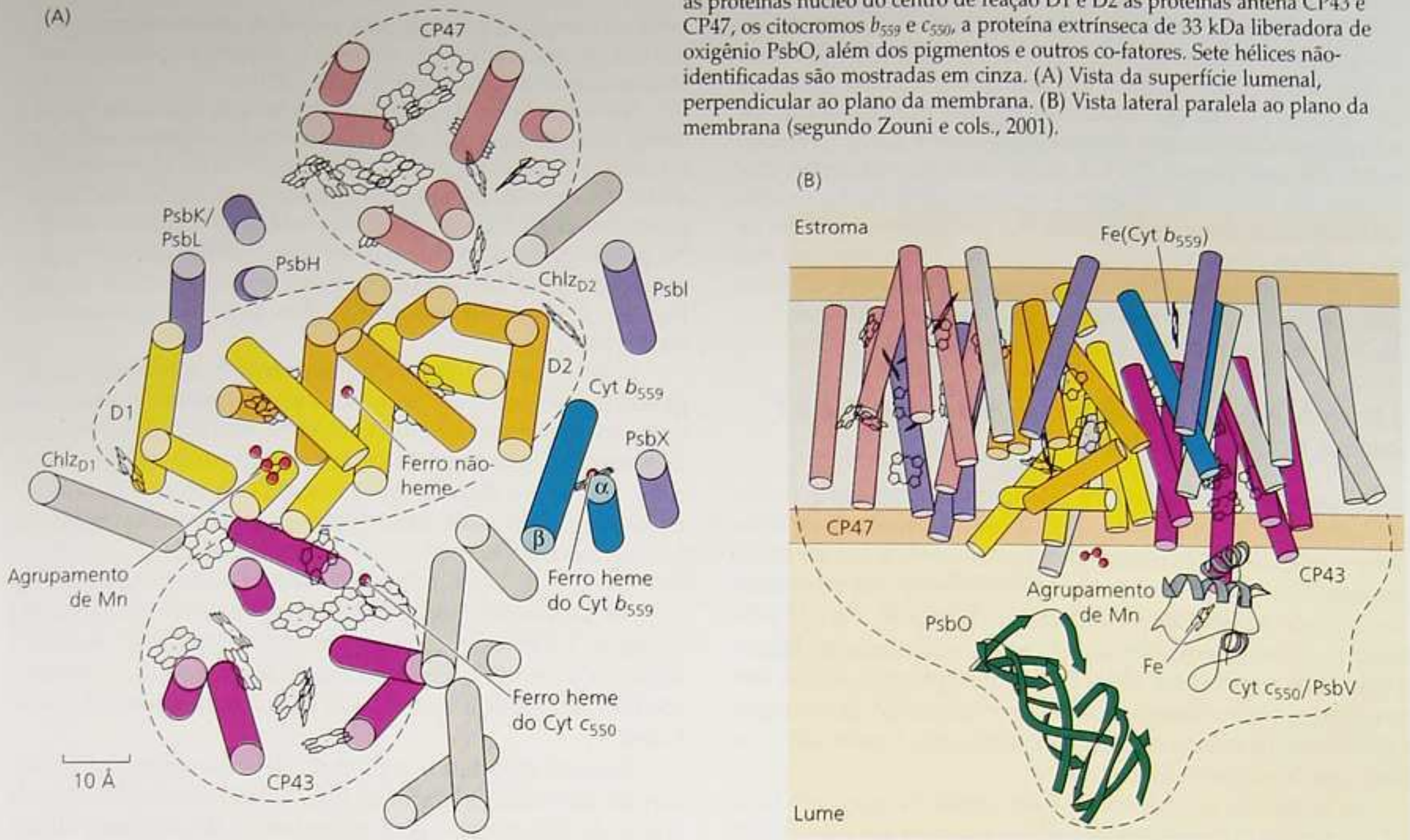



FIGURA 7.26 Modelo do ciclo dos estados S da liberação do oxigênio no PSII. Os estágios sucessivos na oxidação da água via complexo de liberação de oxigênio Mn são mostrados. Yz é um radical de tirosina que é um transportador intermediário de elétrons entre o P680 e o agrupamento de Mn (segundo Tommos e Babcock, 1998).

Duas plastoquinonas (Q_A e Q_B) estão ligadas ao centro de reação e recebem elétrons da feofitina de forma seqüencial (Okamura e cols., 2000). A transferência dos dois elétrons para a Q_B forma Q_B^{2-}(reduzida) e esta Q_B^{2-} reduzida toma dois prótons do lado do estroma, produzindo uma **plasto-hidroquinona** (QH_2) completamente reduzida (Figura 7.27). A plasto-hidroquinona, então, dissocia-se do complexo do centro de reação e entra na porção hidrocarbonada da membrana, onde vai, por sua vez, transferir os seus elétrons para o complexo citicromo b_6f. Diferentemente dos grandes complexos protéicos da membrana do tilacóide, a hidroquinona é uma pequena molécula apolar que se difunde com facilidade no núcleo apolar da bicamada da membrana.

O fluxo de elétrons através do complexo citocromo b_6f também transporta prótons

O **complexo citocromo b_6f** é uma grande proteína com múltiplas subunidades com muitos grupos prostéticos (Cramer, 1996; Berry e cols., 2000). Ele contém dois hemes tipo *b* e um do tipo *c* (citocromo *f*). Nos citocromos do tipo *c*, o heme está covalentemente ligado ao peptídeo; nos citocromos do tipo *b*, o grupo proto-heme quimicamente similar não está covalentemente ligado (Figura 7.28). O complexo ainda contém uma proteína **Rieske ferro-sulfurosa** (assim denominada em homenagem ao cientista que a descobriu), na qual dois átomos de ferro estão ligados em uma ponte por dois átomos de enxofre.

As estruturas do citocromo *f* e do complexo citocromo bc_1 a ele relacionado já foram determinadas e sugerem um mecanismo para o fluxo de prótons e de elétrons. A maneira precisa pela qual os elétrons e prótons fluem pelo complexo citocromo b_6f ainda não está elucidada por completo, mas um mecanismo conhecido como o **ciclo Q** é responsável pela maioria dos eventos observados. Nesse mecanismo, a plastoquinona (QH_2) é oxidada e um dos dois elétrons é passado ao longo da cadeia linear de transporte de elétrons em direção ao fotossistema I, enquanto o outro elétron passa por um processo cíclico que aumenta o número de prótons bombeados através da membrana (Figura 7.29).

Na cadeia linear de transporte de elétrons, a proteína Rieske (**FeS_R**) oxidada aceita um elétron da plasto-hidroquinona (QH_2) e o transfere para o citocromo *f* (ver Figura 7.29A). O citocromo *f*, então, transfere um elétron para a proteína cúprica de cor azulada plastocianina (PC), que, por sua vez, reduz o P700 oxidado do PSI. Na porção cíclica do processo (ver Figura 7.29B), a plastosemiquinona (ver Figura 7.27) transfere seu outro elétron para um dos hemes tipo *b*, liberando seus dois prótons para o lado lumenal da membrana.

O heme tipo *b* transfere seu elétron por intermédio do segundo heme tipo *b* para uma molécula de quinona oxidada, reduzindo-a à forma de semiquinona próximo à superfície estromal do complexo. Outra seqüência similar do fluxo de elétrons reduz completamente a plastoquinona, que captura prótons do lado estromal da membrana e é liberada do complexo b_6f como plasto-hidroquinona.

O resultado líquido de dois *turnovers* do complexo é que dois elétrons são transferidos ao P700, duas plasto-hidroquinonas são oxidadas à forma de quinona e uma plastoquinona oxidada é reduzida à forma de hidroquinona. Além disso, quatro prótons são transferidos do lado estromal para o lado lumenal da membrana.

Por esse mecanismo, o fluxo de elétrons, que conecta o lado aceptor do centro de reação do PSII ao lado doador do centro de reação do PSI, também gera um potencial eletroquímico através da membrana, devido, em parte, à diferença de concentração de H^+ nos dois lados desta membrana. Este potencial eletroquímico é utilizado para fornecer energia à síntese de ATP. O fluxo cíclico de elétrons através do citocromo *b* e da plastoquinona aumenta o número de prótons bombeados por elétrons para além daquilo que poderia ser obtido em uma seqüência estritamente linear.

(A)

Plastoquinona

(B)

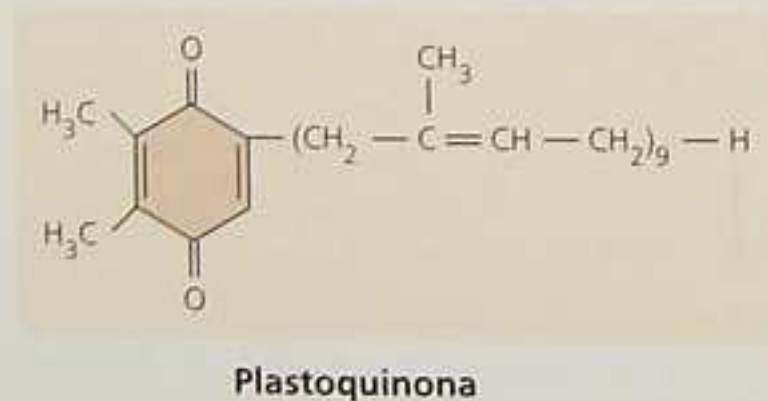



FIGURA 7.27 Estrutura e reações da plastoquinona que opera no fotossistema II. (A) A plastoquinona consiste de uma cabeça quinóide e uma longa cauda apolar que a ancora na membrana. (B) As reações redox da plastoquinona. As formas da quinona totalmente oxidada (Q), semiquinona aniônica ($Q^{\bar{\bullet}}$) e hidroquinona reduzida (QH_2) estão representadas; R representa a cadeia lateral.

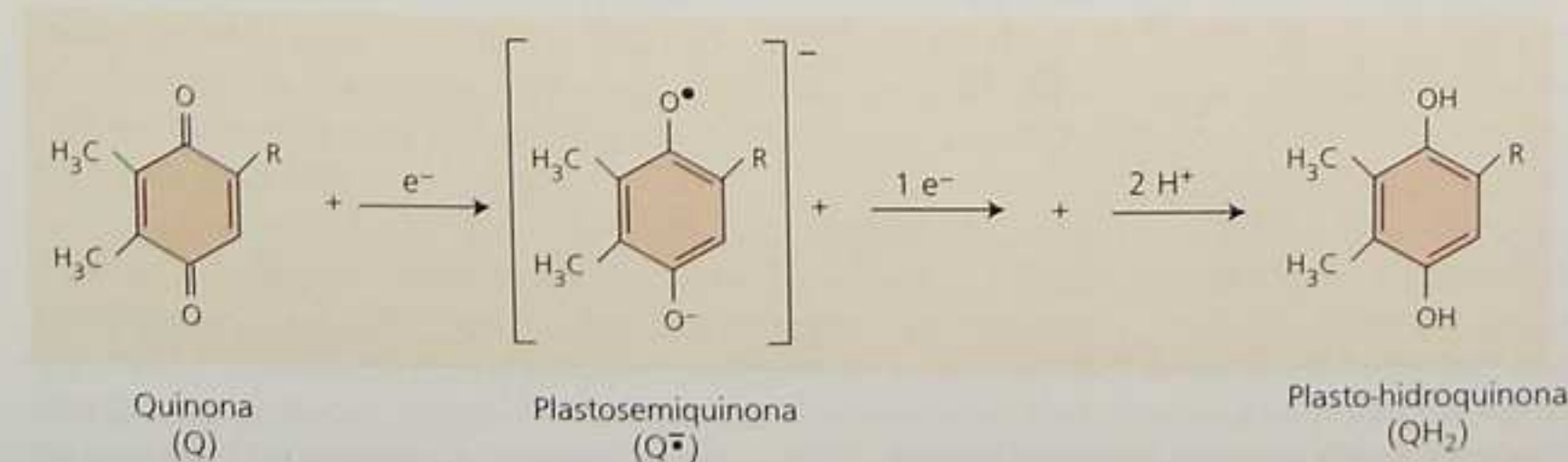
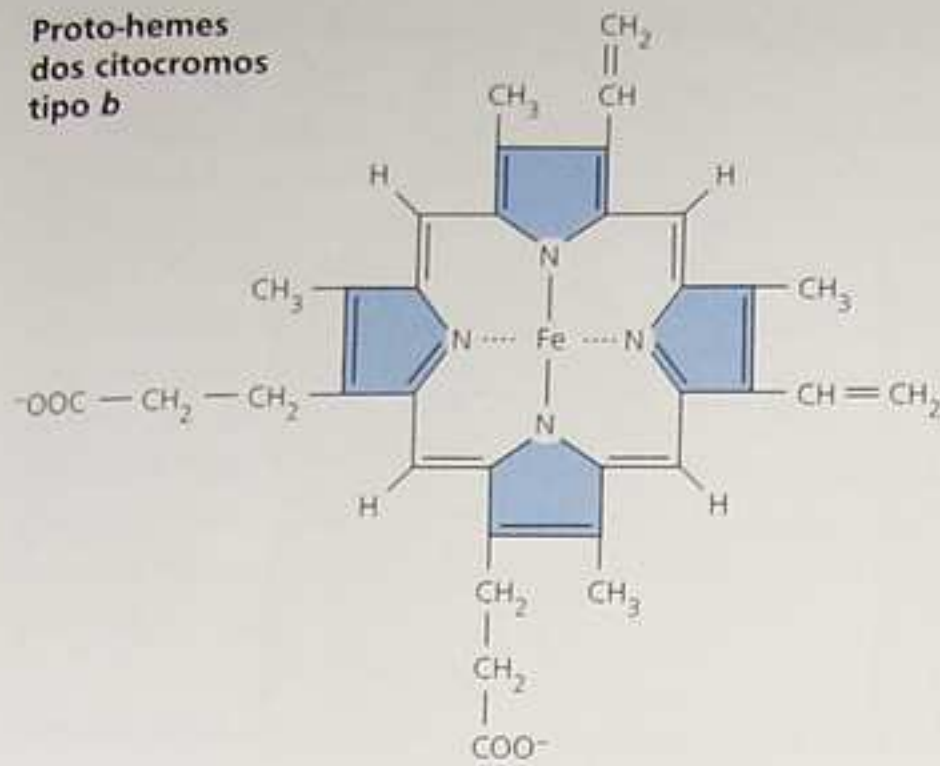
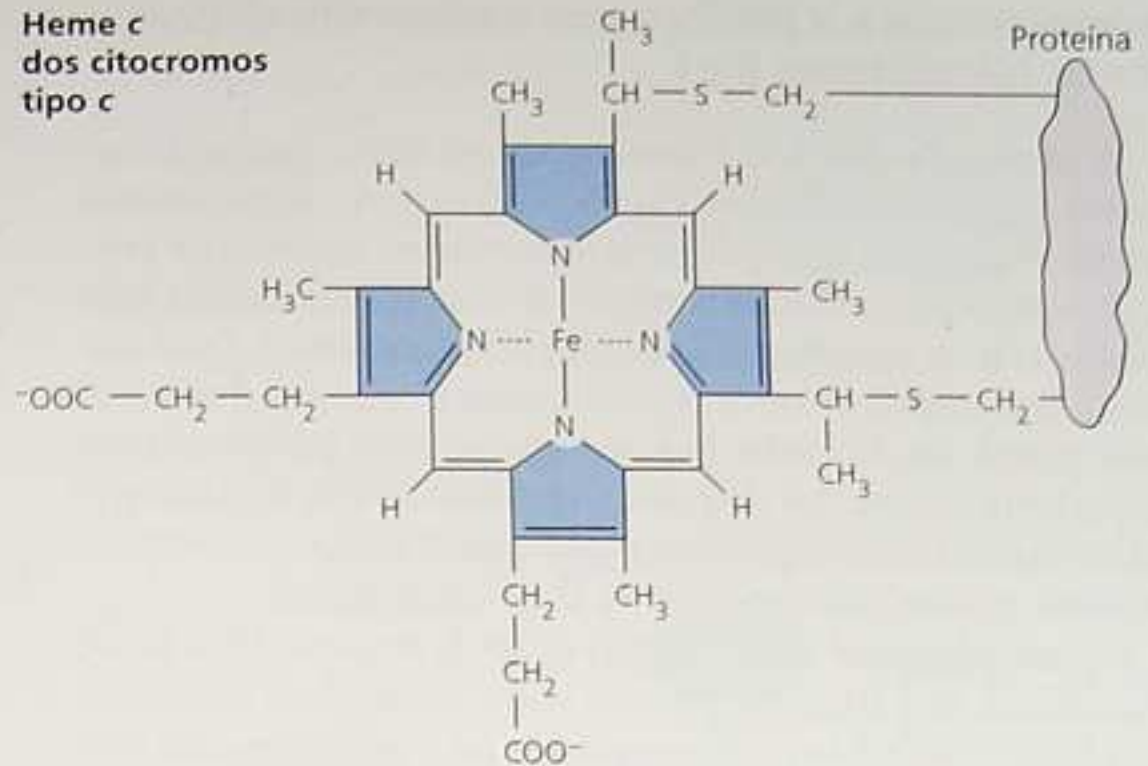



FIGURA 7.28 Estrutura dos grupos prostéticos dos citocromos tipo *b* e *c*. O grupo proto-heme (também chamado de protoporfirina IX) é encontrado nos citocromos do tipo *b*, o grupo heme *c* nos citocromos do tipo *c*. O grupo heme *c* é ligado covalentemente à proteína por ligações tioéteres com dois resíduos de cisteína na proteína; o grupo proto-heme não está covalentemente ligado à proteína. O íon Fe se encontra no estado de oxidação 2+ nos citocromos reduzidos e no estado de oxidação 3+ nos citocromos oxidados.

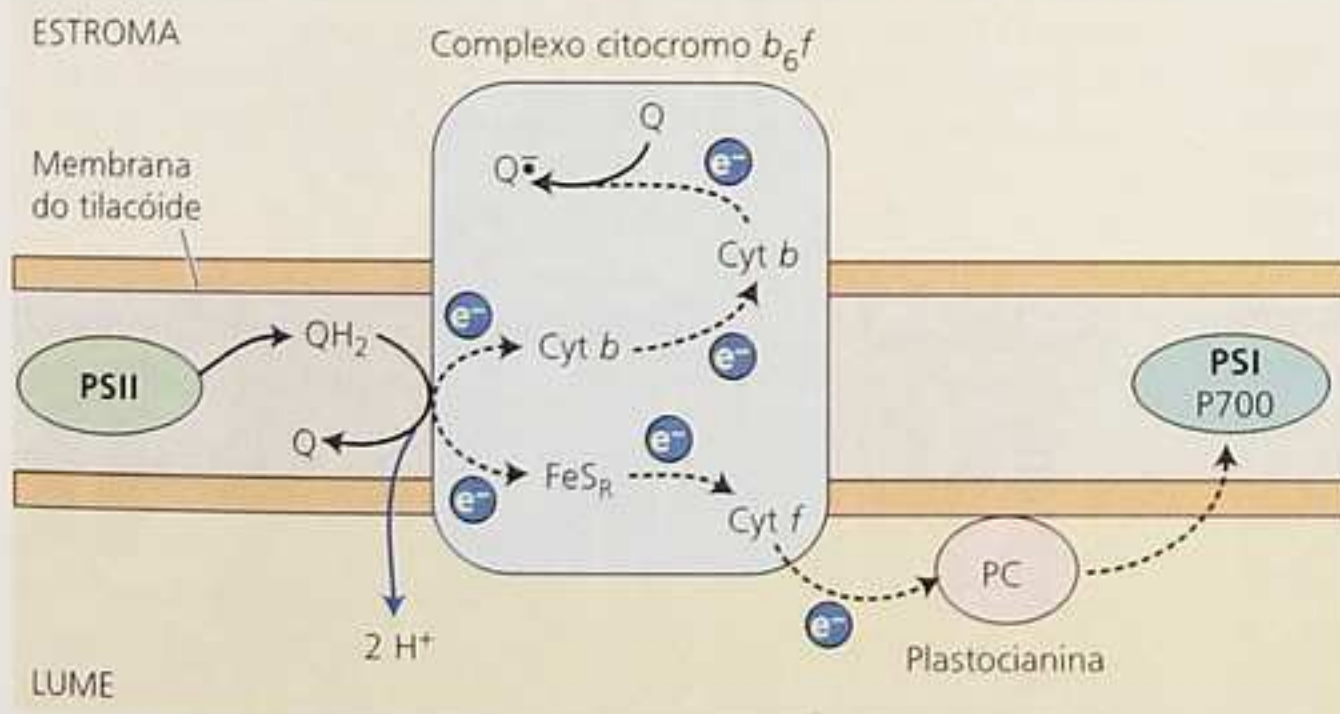
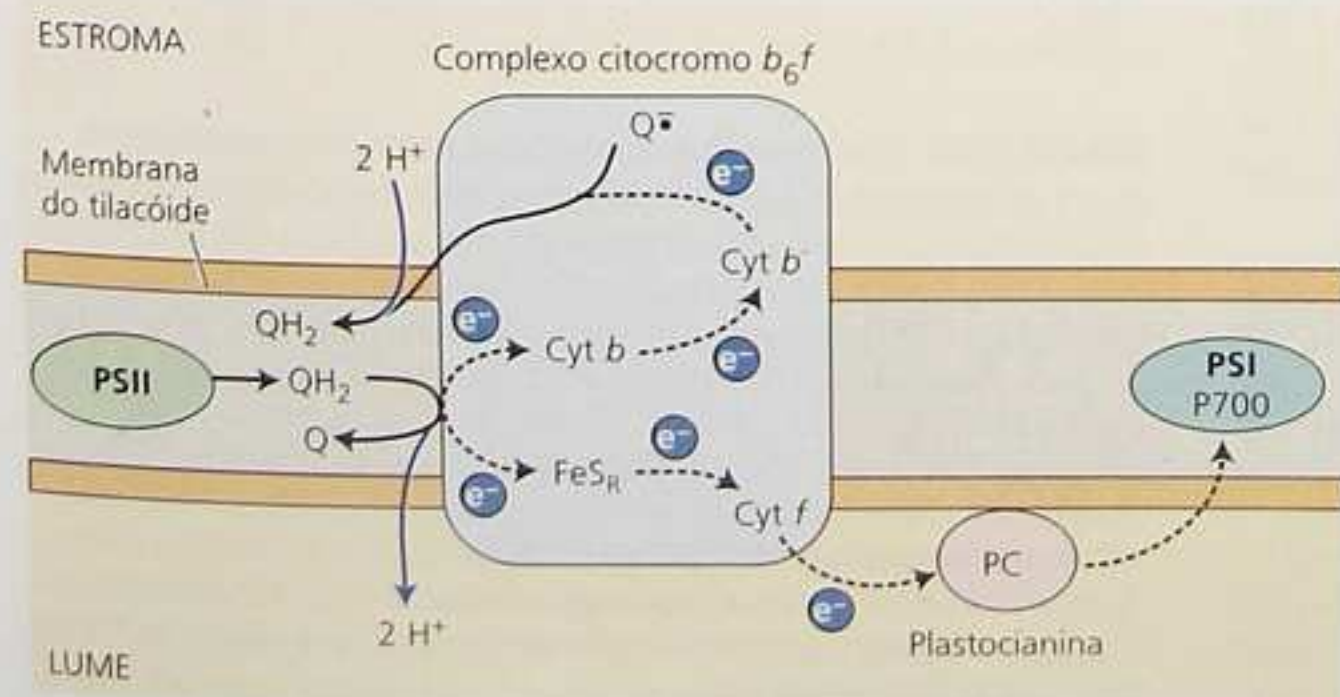



FIGURA 7.29 Mecanismo de transferência de elétrons e prótons no complexo citocromo b_6f, o qual contém dois citocromos do tipo *b* (Cyt-*b*), um citocromo tipo *c* (Cyt *c*, historicamente chamado de citocromo *f*), uma proteína férrica Rieske Fe-S (FeS_R) e dois sítios de oxirredução de quinonas. (A) O processo acíclico ou linear: uma molécula de plasto-hidroquinona (QH_2) produzida pela ação do PSII (ver Figura 7.27) é oxidada próximo do lado lumenal do complexo, transferindo seus dois elétrons para a proteína Rieske Fe-S e um dos citocromos tipo *b* e, simultaneamente, expelindo dois prótons para o lume. O elétron transferido para a FeS_R é passado para o citocromo *f* (Cyt *f*) e daí para a plastocianina (PC), a qual irá reduzir o P700 do PSI. O citocromo tipo *b* reduzido transfere um elétron ao outro citocromo tipo *b*, o qual irá reduzir uma quinona (Q) ao estado de semiquinona (Q•) (ver Figura 7.27). (B) O processo cíclico: uma segunda QH_2 é oxidada com um elétron indo da FeS_R para a PC e finalmente para o P700. O segundo elétron viaja através dos dois citocromos tipo *b* e reduz a semiquinona a plasto-hidroquinona, pegando, ao mesmo tempo, dois prótons do estroma. Em geral, quatro prótons são transportados pela membrana para cada dois elétrons enviados ao P700.

A plastoquinona e a plastocianina transportam elétrons entre os fotossistemas II e I

A localização dos dois fotossistemas em diferentes locais nas membranas do tilacóide (ver Figura 7.18) exige que pelo menos um componente seja capaz de se movimentar ao longo ou no interior da membrana, a fim de entregar os elétrons produzidos pelo fotossitema II ao fotossistema I. O complexo citocromo b_6f está distribuído igualmente entre as regiões granal e estromal das membranas, porém seu tamanho grande torna-o pouco provável como transportador móvel. Ao contrário, considera-se que a plastoquinona ou platocianina ou possivelmente ambas sirvam como transportadores móveis que conectam os dois fotossistemas.

A **plastocianina** é uma proteína cúprica, pequena (10,5 kDa), hidrossolúvel, que transfere elétrons entre o complexo citocromo b_6f e o P700. Essa proteína é encontrada no espaço lumenal (ver Figura 7.29). Em certas algas verdes e cianobactérias, um citocromo tipo *c* é encontrado em algumas ocasiões, em vez da plastocianina. Qual destas duas proteínas que será produzida vai depender da quantidade de cobre disponível no organismo.

O centro de reação do fotossistema I reduz o $NADP^+$

O complexo do centro de reação PSI é um grande complexo protéico com múltiplas subunidades (Figura 7.30) (Jordan e cols., 2001). Ao contrário do PSII, um núcleo antena consistindo de aproximadamente 100 clorofilas é parte integrante do centro de reação PSI, P700. O núcleo antena e o P700 estão ligados a duas proteínas, PsaA e PsaB, com massas moleculares na faixa de 66 a 70 kDa (Brettel, 1997; Chitnis, 2001; ver também **Tópico 7.8 na Internet**).

Os pigmentos antena formam um bojo ao redor dos co-fatores de transferência de elétrons, que se encontram no centro do complexo. Na sua forma reduzida, os transportadores de elétrons que atuam na região aceptora do fotossistema I são agentes redutores extremamente fortes. Estas espécies reduzidas são muito instáveis e, assim, de difícil identificação. As evidências indicam que um desses aceptores primários é uma molécula de clorofila e outro, uma espécie de quinona, filoquinona, também conhecida como vitamina K_1.

Os aceptores adicionais de elétrons incluem uma série de três proteínas ferro-sulfurosas associadas à membrana ou a ferredoxinas ligadas, também conhecidos como **centros Fe-S: FeS_X, FeS_A, e FeS_B** (ver Figura 7.30). FeS centro X é parte da proteína ligante P700; centros A e B residem em uma proteína de 8 kDa que faz parte do complexo do centro de reação PSI. Elétrons são transferidos através dos centros A e B para a **ferredoxina (Fd)**, uma pequena proteína ferro-sulfurosa hidrossolúvel (ver Figuras 7.21 e 7.30). A flavoproteína associada à membrana **Ferredoxina-NADP redutase (FNR)** reduz o $NADP^+$ a NADPH, completando, assim, a seqüência do transporte acíclico de elétrons, que inicia com a oxidação da água (Karplus e cols., 1991).

Além da redução do $NADP^+$, a ferredoxina reduzida produzida pelo fotossistema I possui várias outras funções no cloroplasto, tais como o suprimento de redutores para reduzir o nitrato e a regulação de algumas das enzimas da fixação do carbono (ver Capítulo 8).

(A)
Estroma
Fd
Fd⁻
D
E
FeS_A
FeS_B
C
K
PsaA
PsaB
L I
FeS_X
A_1
A_0
H G
J
P700
N
F
PC
Luz
PC⁻
Lume

(B)
PsaC
Estroma
PsaE
PsaD
Lume

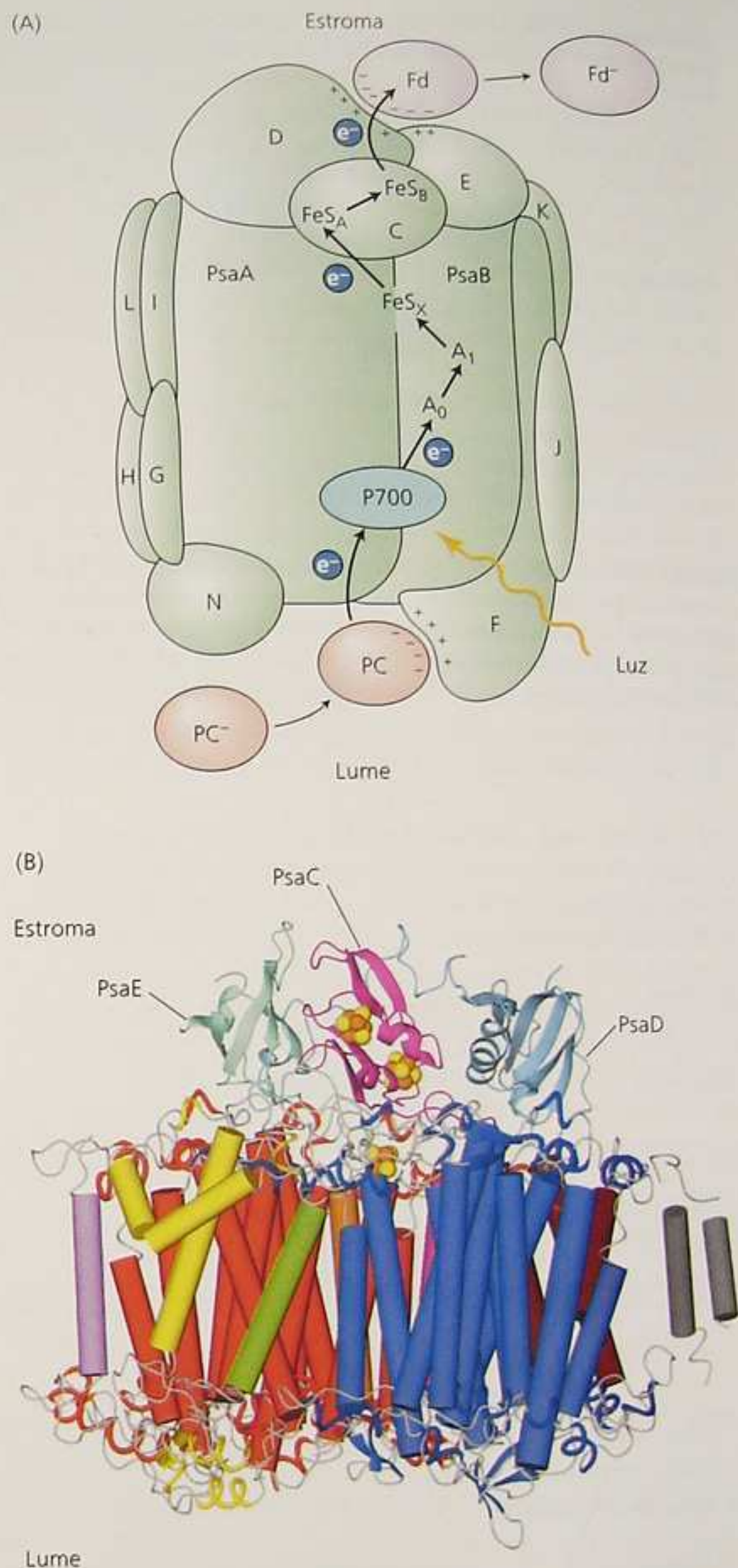



FIGURA 7.30 Estrutura do fotossistema I. (A) Modelo estrutural do centro de reação do PSI. Os componentes do centro de reação PSI estão organizados ao redor de duas proteínas principais, PsaA e PsaB. Proteínas secundárias PsaC a PsaN estão identificadas C a N. Os elétrons são transferidos da plastocianina (PC) para o P700 (ver Figuras 7.21 e 7.22) e daí para uma molécula de clorofila, A_0, para uma filoquinona, A_1, para os centros Fe-S, FeS_X, FeS_A, e FeS_B, e, finalmente, para a proteína ferro-sulfurosa, ferredoxina (Fd). (B) Vista lateral de um monômero do PSI da cianobactéria *Synechococcus elongatus* em uma resolução de 2.5Å. O lado estromal da membrana está no topo e o lado lumenal, na parte de baixo da figura. As α-hélices transmembranas da PsaA e PsaB são mostradas como cilindros azuis e vermelhos, respectivamente (A segundo Buchanan e cols., 2000; B de Jordan e cols., 2001).

O fluxo cíclico de elétrons gera ATP, mas não NADPH

Alguns complexos citocromo b_6f são encontrados na região do estroma da membrana, onde está localizado o fotossistema I. Sob certas circunstâncias, sabe-se que pode ocorrer um **fluxo cíclico de elétrons** do lado redutor do fotossistema I, por intermédio do complexo b_6f e de volta ao P700. Este fluxo cíclico de elétrons está acoplado ao bombeamento de prótons para o lume, os quais podem ser utilizados para a síntese de ATP, mas não oxida a água ou reduz $NADP^+$. O fluxo cíclico de elétrons é especialmente importante como uma fonte de ATP nos cloroplastos da bainha vascular de algumas plantas que possuem o tipo C_4 de fixação de CO_2 (ver Capítulo 8).

Alguns herbicidas bloqueiam o fluxo de elétrons

O uso de herbicidas para matar plantas indesejáveis é largamente adotado na agricultura moderna. Muitas classes diferentes de herbicidas foram desenvolvidas e eles agem bloqueando a biossíntese de aminoácidos, carotenóides ou lipídeos ou perturbando a divisão celular. Outros herbicidas, tais como DCMU (diclorofenildimetiluréia) e paraquat, bloqueiam o fluxo de elétrons fotossintéticos (Figura 7.31). DCMU é também conhecido como diuron. O paraquat adquiriu notoriedade devido ao seu uso nas plantações de cânhamo.

Muitos herbicidas, entre eles DCMU, atuam bloqueando o fluxo de elétrons nos aceptores quinona do fotossistema II, competindo pelo sítio de ligação da plastoquinona que é em geral ocupado pela Q_B. Outros herbicidas, tais como paraquat, agem aceitando elétrons do aceptor primário do fotossistema I e, então, reagindo com o oxigênio para formar superóxido, O_2^-, uma espécie que é muito prejudicial aos componentes do cloroplasto, especialmente os lipídeos.

FIGURA 7.31 Estrutura química e mecanismo de ação de dois importantes herbicidas. (A) Estrutura química do diclorofenil-dimetiluréia (DCMU) e metil viologen (paraquat), herbicidas que bloqueiam o fluxo de elétrons fotossintéticos. O DCMU é também conhecido como diuron. (B) Sítios de ação dos dois herbicidas. O DCMU bloqueia o fluxo de elétrons nos aceptores quinona do fotossistema II, por competição com o sítio de ligação da plastoquinona. O paraquat atua recebendo elétrons dos aceptores primários do fotossistema I.

O TRANSPORTE DE PRÓTONS E A SÍNTESE DE ATP NO CLOROPLASTO

As seções anteriores, mostraram como a energia capturada da luz é utilizada para reduzir o $NADP^+$ a NADPH. Outra fração desta energia capturada é utilizada para a síntese do ATP dependente da luz, a qual é conhecida como **fotofosforilação**, processo descoberto por Daniel Arnon e seus colaboradores na década de 1950. Sob condições celulares normais, a fotofosforilação requer fluxo de elétrons, embora sob certas condições o fluxo de elétrons e a fotofosforilação possam ocorrer independentemente. O fluxo de elétrons sem o acompanhamento da fosforilação é dito **desacoplado.**

Hoje é amplamente aceito que a fotofosforilação funciona via **mecanismo quimiosmótico,** proposto pela primeira vez por Peter Mitchell, na década de 1960. O mesmo tipo de mecanismo aciona a fosforilação durante a respiração aeróbica em bactérias e na mitocôndria (ver Capítulo 11), bem como a transferências de muitos íons e metabólitos através de membranas (ver Capítulo 6). A quimiosmose parece ser um aspecto unificador dos processos de membrana em todas as formas de vida.

No Capítulo 6, foi discutido o papel das ATPases na quimiosmose e no transporte de íons na membrana plasmática das células. O ATP utilizado pela ATPase da membrana plasmática é sintetizado pela fotofosforilação no cloroplasto e pela fosforilação oxidativa na mitocôndria. Aqui, o interesse é a quimiosmose e as diferenças de concentração transmembrana de prótons utilizadas para produzir ATP no cloroplasto.

O princípio básico da quimiosmose é que as diferenças na concentração de íons e as diferenças no potencial elétrico através das membranas são uma fonte de energia livre que pode ser utilizada pela célula. Como descrito pela segunda lei da termodinâmica (ver Capítulo 2 na Internet para uma discussão mais detalhada), qualquer distribuição não uniforme de matéria ou energia representa uma fonte de energia. As diferenças no **potencial químico** de qualquer espécie molecular cujas concentrações não são as mesmas em lados opostos de uma membrana fornecem tal fonte de energia.

A natureza assimétrica da membrana fotossintética e o fato que o fluxo de prótons de um lado para outro da membrana acompanha o fluxo de elétrons foram discutidos anteriormente. A direção da translocação de prótons é tal que o estroma torna-se mais alcalino (menos íons H^+) e o lume mais ácido (mais íons H^+), como resultado do transporte de elétrons (ver Figuras 7.22 e 7.29).

Algumas das primeiras evidências respaldando o mecanismo quimiosmótico da formação fotossintética de ATP foi fornecida pelo elegante experimento conduzido por André Jagendorf e colaboradores (Figura 7.32). Eles colocaram tilacóides de cloroplastos em uma suspensão tampão de pH 4 e o tampão difundiu através da

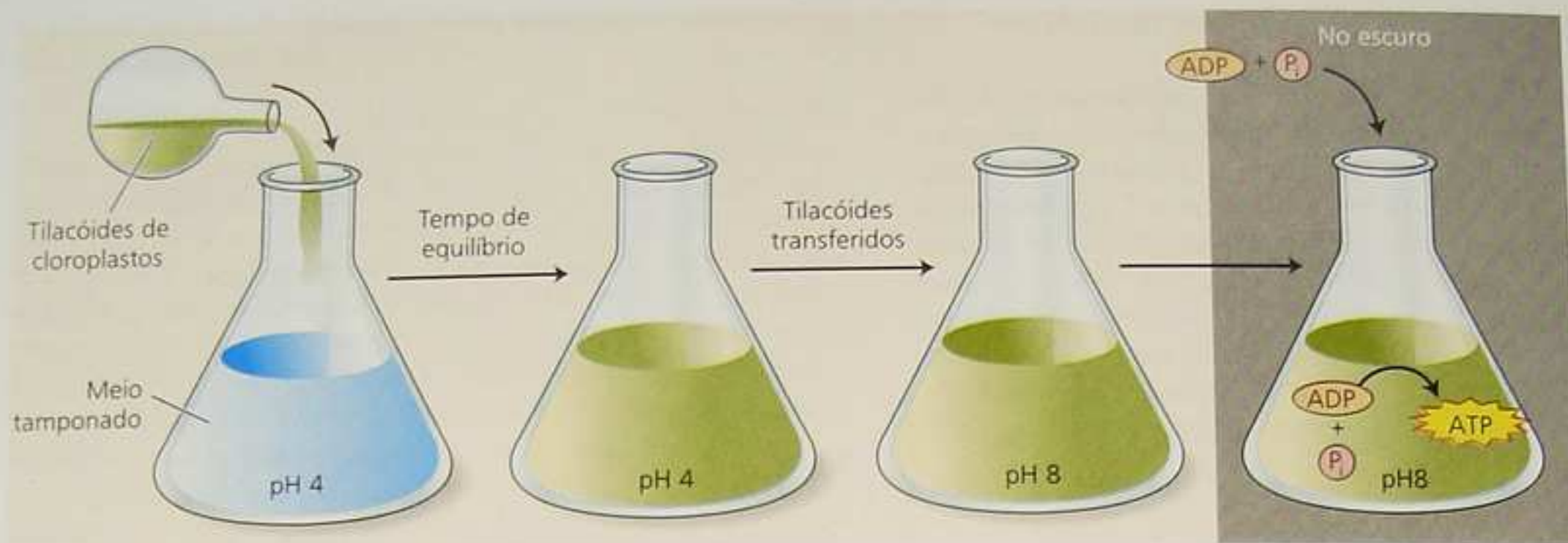



FIGURA 7.32 Resumo do experimento realizado por Jagendorf e colaboradores. Os tilacóides isolados de cloroplastos e mantidos previamente em pH 8 são equilibrados em um meio ácido em pH 4. Os tilacóides são, então, transferidos para um tampão em pH 8 contendo ADP e P_i. O gradiente de prótons gerado por esta manipulação forneceu uma força propulsora para a síntese de ATP na ausência da luz. Este experimento confirmou as predições da teoria quimiosmótica segundo a qual um potencial químico através da membrana pode fornecer energia para a síntese de ATP.

membrana, causando um equilíbrio neste pH ácido entre o interior e exterior do tilacóide. Eles, então, transferiram os tilacóides para um tampão de pH 8, criando, assim, uma diferença de pH de 4 unidades através da membrana do tilacóide, com o interior mais ácido do que o exterior.

Eles verificaram que grandes quantidades de ATP eram formadas a partir de ADP + P_i por meio desse processo, sem a entrada de luz ou transporte de elétrons. O resultado dá suporte às predições da hipótese quimiosmótica, descrita nos parágrafos seguintes.

Mitchell propôs que toda energia disponível para a síntese de ATP, chamado de **força motora de prótons** (Δp), é a soma de um potencial químico de prótons e o potencial elétrico transmembrana. Esses dois componentes da força motora de prótons do lado de fora da membrana para o interior são dados pela seguinte equação:

$$\Delta_p = \Delta E - 59(pH_i - pH_o) \qquad 7.9$$

onde ΔE é o potencial elétrico transmembrana e pH_i — pH_0 (ou ΔpH), a diferença de pH através da membrana. A constante de proporcionalidade (a 25 °C) é 59 mV por unidade de pH, de forma que uma diferença transmembrana de 1 unidade de pH é equivalente a um potencial de membrana de 59 mV.

Sob condições de equilíbrio dinâmico do transporte de elétrons nos cloroplastos, o potencial elétrico da membrana é bastante pequeno devido ao movimento de íons na membrana, de modo que Δp é formado quase exclusivamente pelo ΔpH. A estequiometria de prótons translocados por ATP sintetizado foi recentemente calculada em quatro H^+ íons por ATP (Haraux e De Kouchkovsky, 1998).

Além da necessidade de transportadores móveis de elétrons já discutidos, a distribuição desigual de fotossitemas II e I e da ATP sintase na membrana do tilacóide (ver Figura 7.18) são algumas das dificuldades encontradas para a formação do ATP. A ATP sintase é encontrada apenas nas lamelas estromais e nas margens das pilhas dos *grana*. Os prótons bombeados através da membrana pelo complexo citocromo b_6f ou os prótons produzidos pela oxidação da água no meio dos grana necessitam se movimentar lateralmente várias dezenas de nanômetros para alcançar a ATP sintase.

O ATP é sintetizado por um grande complexo enzimático (400 kDa) conhecido por vários nomes: **ATP sintase**, **ATPase** (pela reação reversa de hidrólise do ATP) e **CF_0-CF_1** (Boyer, 1997). Essa enzima consiste de duas partes: uma porção hidrofóbica ligada à membrana, chamada CF_0, e uma porção que sai da membrana para dentro do estroma, chamada CF_1 (Figura 7.33).

A CF_0 parece formar um canal através da membrana, pelo qual os prótons podem passar. A CF_1 é formada por vários peptídeos, incluindo três cópias de cada um dos peptídeos α e β arranjados alternadamente de forma similar aos gomos de uma laranja. Enquanto os sítios catalíticos estão localizados primariamente nos β-polipeptídeos, acredita-se que muitos dos outros peptídeos tenham uma função primeiramente de regulação. A CF_1 é a porção do complexo onde o ATP é sintetizado.

A estrutura molecular da ATP sintase mitocondrial já foi determinada por cristalografia de raios X (Stock e cols., 1999). Embora haja diferenças significantes entre as enzimas dos cloroplastos e mitocôndrias, elas têm a mesma arquitetura geral e, provavelmente, sítios catalíticos quase idênticos. De fato, existem similaridades marcantes na forma como o fluxo de elétrons está acoplado à translocação de prótons nos cloroplastos, mitocôndrias e bactérias púrpura (Figura 7.34). Outro aspecto marcante do mecanismo da ATP sintase é que o ramo interno e provavelmente muito da porção CF_0 da enzima giram durante a catálise (Yasuda e cols., 2001). Essa enzima é na realidade um minúsculo motor molecular (ver **Tópicos 7.9 e 11.4 na Internet**).

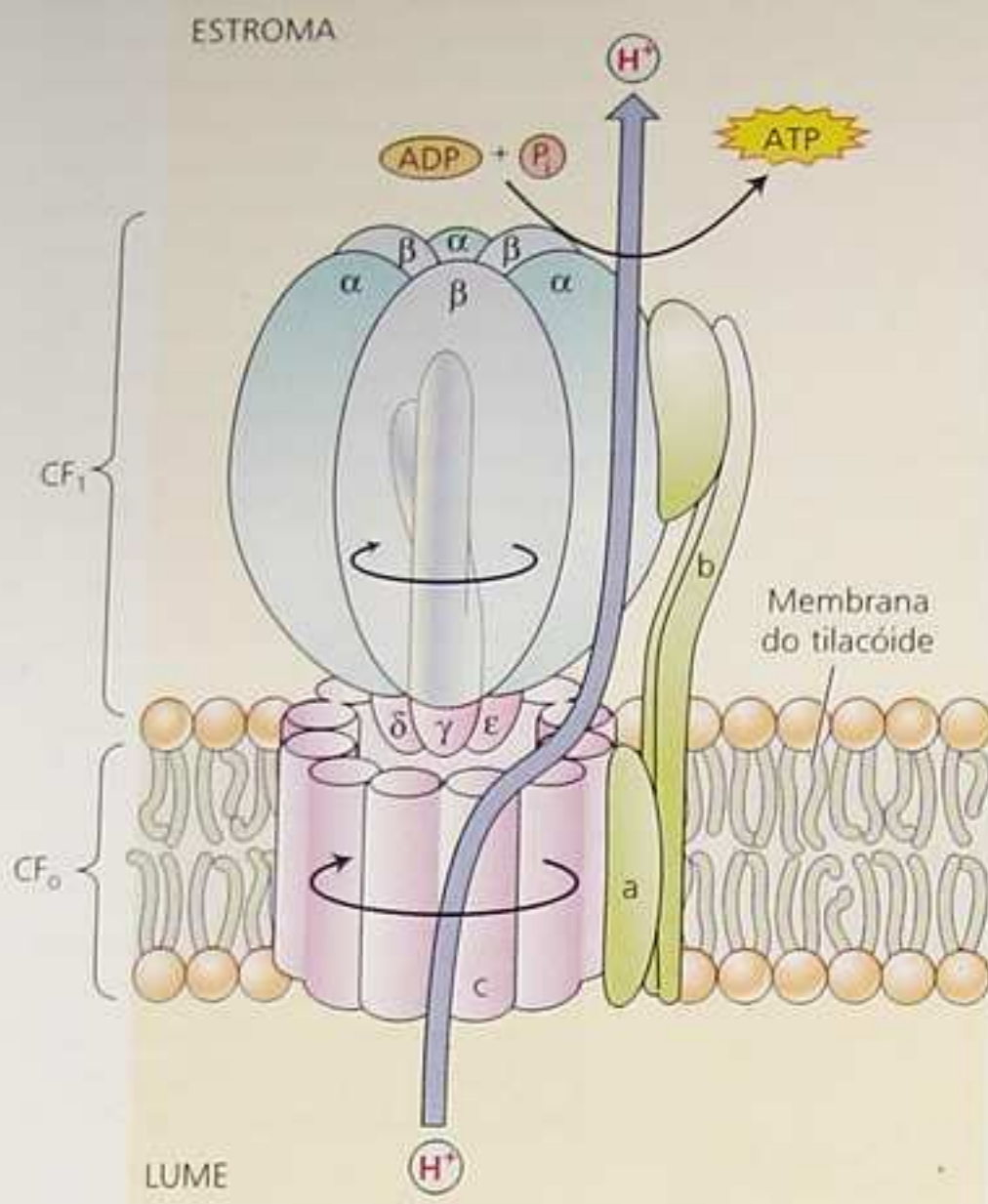



FIGURA 7.33 Estrutura da ATP sintase. Esta enzima consiste de um grande complexo com múltiplas subunidades, CF_1, ligado no lado estromal da membrana à uma porção integral de membrana conhecida como Cf_0. A CF_1 consiste de cinco diferentes polipeptídeos, com uma estequiometria de α_3, β_3, γ, δ, ε. A Cf_0 contém provavelmente quatro diferentes polipeptídeos, com uma estequiometria da a, b, b', c_{12}.

REPARO E REGULAÇÃO DA MAQUINARIA FOTOSSINTÉTICA

Os sistemas fotossintéticos enfrentam um desafio especial. Eles são construídos para absorver grandes quantidades de energia luminosa e transformá-la em energia química. Em nível molecular, a energia presente em um fóton pode ser danosa, especialmente sob condições desfavoráveis. A energia luminosa em excesso pode levar à produção de espécies tóxicas, tais como superóxidos, oxigênio singleto e peróxidos, podendo ocorrer danos se tal energia luminosa não for dissipada com segurança. (Horton e cols., 1996; Asada, 1999; Müller e cols., 2001). Os organismos fotossintéticos, portanto, possuem complexos mecanismos de regulação e reparo. Alguns desses mecanismos regulam o fluxo de energia no sistema de antenas, a fim de evitar excesso de excitação dos centros de reação e garantir que os dois fotossistemas sejam igualmente operados. Embora muito efetivos, tais processos não são inteiramente à prova de falhas e, às vezes, podem ser produzidos compostos tóxicos. Mecanismos adicionais são necessários para dissipar esses compostos — em particular as espécies tóxicas de oxigênio.

A despeito desses mecanismos de proteção e de limpeza, podem ocorrer danos, e mecanismos adicionais são necessários para reparar o sistema. A Figura 7.35 oferece uma visão geral dos vários níveis dos sistemas de regulação e reparo.

Os carotenóides servem como agentes fotoprotetores

Além da sua função como pigmento acessório, os carotenóides desempenham um papel essencial na **fotoproteção.** As membranas fotossintéticas podem ser facilmente danificadas pelas grandes quantidades de energia absorvida pelos pigmentos, se essa energia não puder ser armazenada pela fotoquímica; esta é a razão da necessidade de um mecanismo de proteção. O mecanismo de fotoproteção pode ser visto como uma válvula de segurança, liberando o excesso de energia antes que possa danificar o organismo. Quando a energia armazenada nas clorofilas no seu estado excitado é rapidamente dissipada pela transferência de excitação ou fotoquímica, o estado de excitação é dito *quenched*.

Se o estado excitado da clorofila não é rapidamente *quenched* pela transferência de excitação ou de fotoquímica, ela pode reagir com o oxigênio molecular para formar um estado excitado do oxigênio conhecido como **oxigênio singleto** ($^1O_2^*$). Esse oxigênio singleto, extremamente reativo, segue em frente, reagindo e danificando muitos componentes celulares, especialmente lipídeos. Os carotenóides exercem sua ação protetora por meio do rápido *quenching* (ver Glossário) dos estados excitados da clorofila. O estado excitado dos carotenóides não possui energia suficiente para formar oxigênio singleto, de modo que ele decai de volta ao estado inicial enquanto perde sua energia sob forma de calor.

Organismos mutantes sem carotenóides não podem viver na presença de luz e oxigênio molecular — uma situação difícil para organismos fotossintelizantes produtores de O_2. Para bactérias fotossintetizantes não-produtoras de O_2 os mutantes que não possuem carotenóides podem ser mantidos em condições de laboratório se o oxigênio for excluído do meio de cultura.

Recentemente, foi descoberta uma participação dos carotenóides no *quenching* não-fotoquímico, que é um segundo mecanismo de regulação e proteção.

Algumas xantofilas também participam na dissipação da energia

O *quenching* não-fotoquímico, um dos principais processos que regulam a distribuição da energia de excitação para os centros de reação, pode ser visto como um "botão para ajuste de volume" que regula o fluxo de excitações para o centro de reação do PSII em um nível aceitável, dependendo da intensidade luminosa e outras condições. O processo parece ser uma parte essencial da regulação do sistema de antena na maioria das algas e plantas superiores.

O ***quenching* não-fotoquímico** é o *quenching* da fluorescência da clorofila (ver Figura 7.5) por processos outros que não a fotoquímica. Como resultado do *quenching* não-fotoquímico, uma grande fração da excitações no sistema de antena causadas pela iluminação intensa é eliminada por sua conversão em calor (Krause e Weis, 1991). Acredita-se que o *quenching* não-fotoquímico está envolvido na proteção do maquinario fotossintético contra a super-excitação e o subseqüente dano.

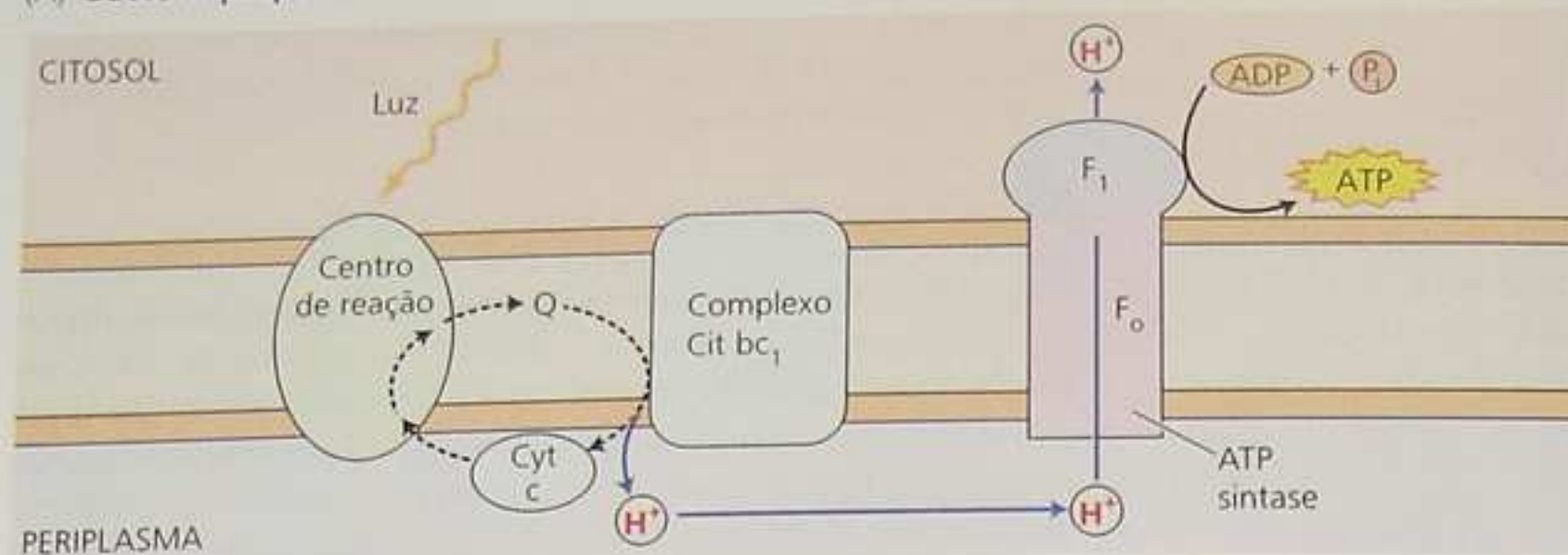
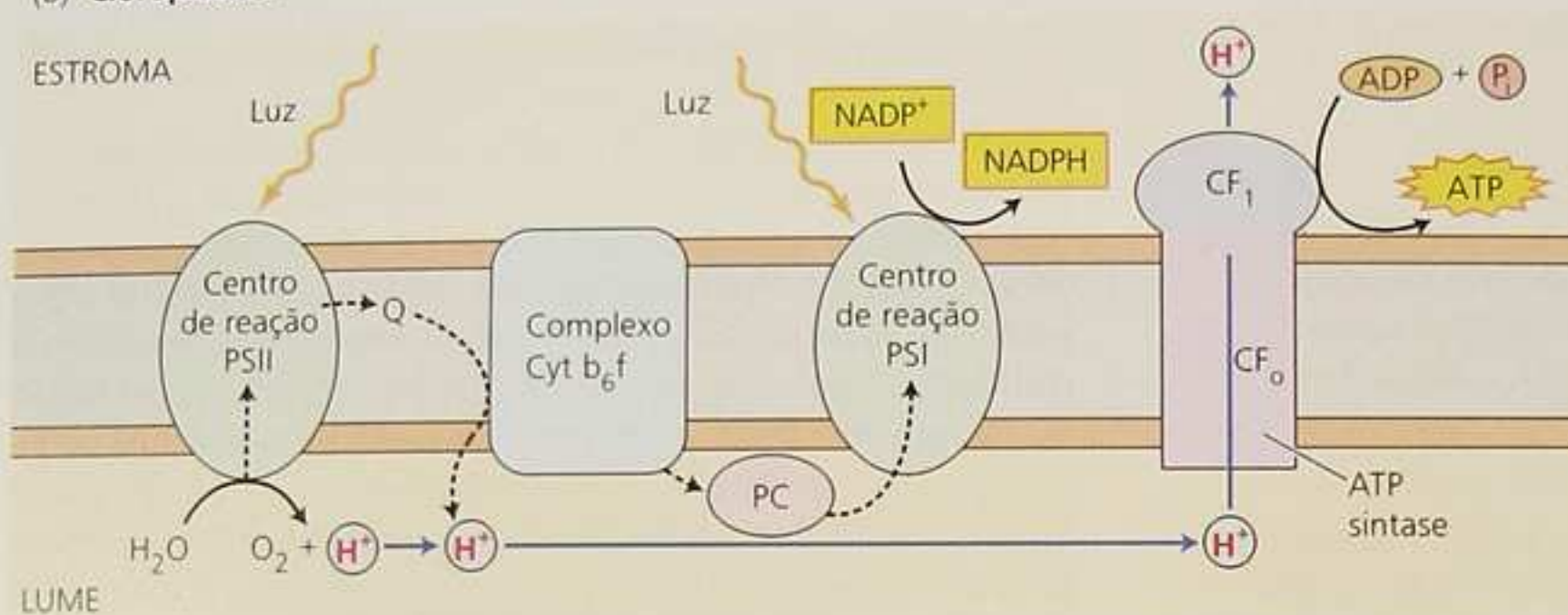
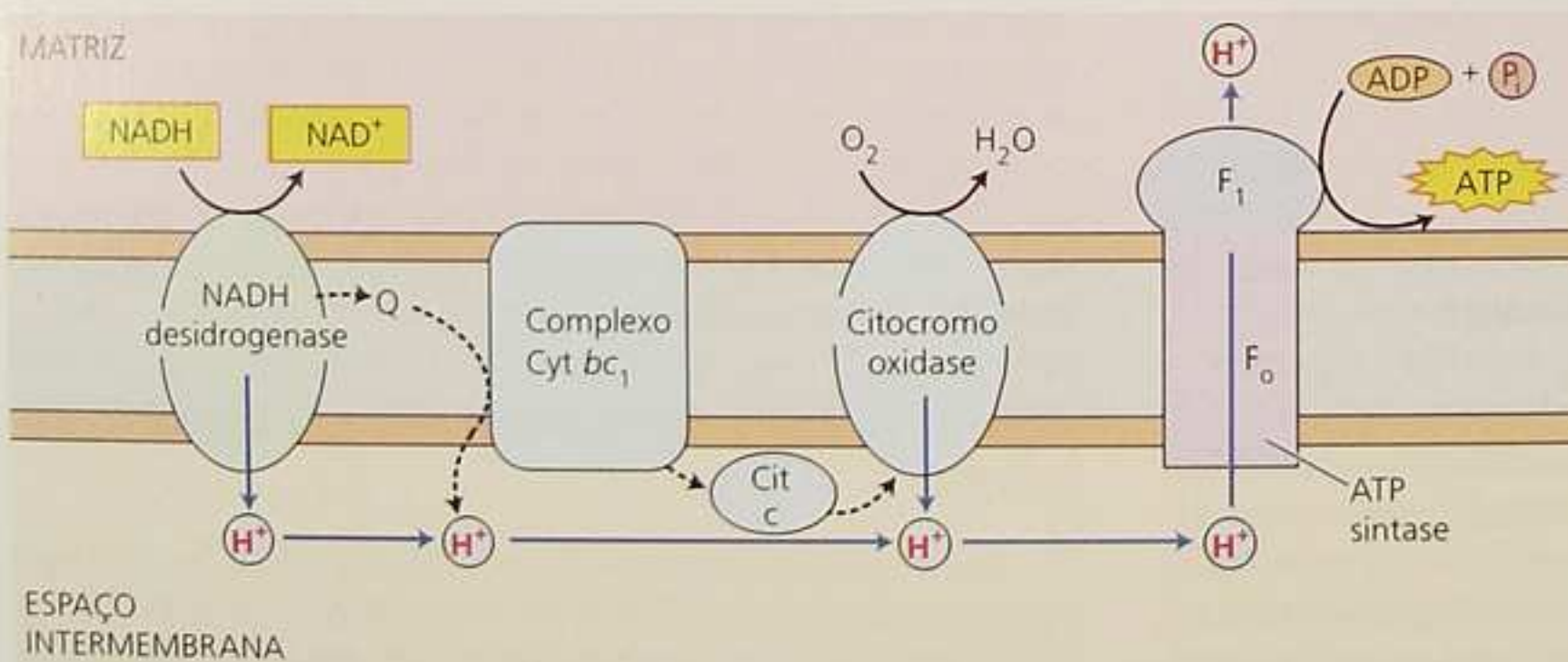



FIGURA 7.34 Similaridades entre o fluxo fotossintético e respiratório de elétrons em bactérias, cloroplastos e mitocôndrias. Nos três, o fluxo de elétrons está acoplado à translocação de prótons, criando uma força motora de prótons transmembrana (Δp). A energia na força motora de prótons é, então, utilizada para a síntese de ATP pela ATP sintase. (A) Um centro de reação (RC) na bactéria púrpura fotossintetizante realiza o fluxo cíclico de elétrons, gerando um potencial de prótons pela ação do complexo citocromo bc_1. (B) Os cloroplastos realizam o fluxo acíclico de elétrons, oxidando a água e reduzindo o $NADP^+$. Prótons são produzidos pela oxidação da água e pela oxidação da PQH_2 (Q) pelo complexo citocromo b_6f. (C) A mitocôndria oxida NADH a NAD^+ e reduz oxigênio à água. Prótons são bombeados pela enzima NADH desidrogenase, complexo citocromo bc_1 e citocromo oxidase. A ATP sintase nos três sistemas são muito similares em estrutura.

O mecanismo molecular do *quenching* não-fotoquímico não está ainda bem compreendido, embora esteja claro que o pH do lume do tilacóide e o estado de agregação dos complexos antena são fatores importantes. Três carotenóides, chamados **xantofilas**, estão envolvidos no *quenching* não-fotoquímico: violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (Figura 7.36).

Em condições de alta luminosidade, a violaxantina é convertida em zeaxantina, via intermediário anteraxantina, pela enzima violaxantina de-epoxidase. Quando a intensidade luminosa decresce, o processo é invertido. Acredita-se que a ligação de os prótons e a da zeaxantina às proteínas da antena de captação de luz cause alterações na conformação que levam ao *quenching* e à dissipação do calor (Demmig-Adams e Adams, 1992; Horton e cols., 1996). O *quenching* não-fotoquímico parece estar preferencialmente associado ao complexo antena periférico do fotossistema II, a proteína PsbS (Li e cols., 2000).

O centro de reação do fotossistema II é facilmente danificado

Um outro efeito que parece ser fator importante na estabilidade do aparelho fotossintético é a fotoinibição que ocorre quando o

FIGURA 7.35 Visão geral da regulação da captura de fótons e da proteção e reparo de dano causado pela luz. A proteção ao dano causado pela luz é um processo com muitos níveis. A primeira linha de defesa é a supressão do dano pelo *quenching* do excesso de excitação na forma de calor. Se essa defesa não for suficiente e se formarem produtos tóxicos, uma variedade de sistemas de remoção elimina os produtos reativos. Se a segunda linha de defesa também falhar, os produtos resultantes do excesso de excitação podem danificar a proteína D1 do fotossistema II. Este dano leva à fotoinibição. A proteína D1 é, então, removida do centro de reação PSII e degradada. Uma nova proteína D1 é sintetizada e reinserida no centro de reação PSII, para formar uma unidade funcional (segundo Asada, 1999).

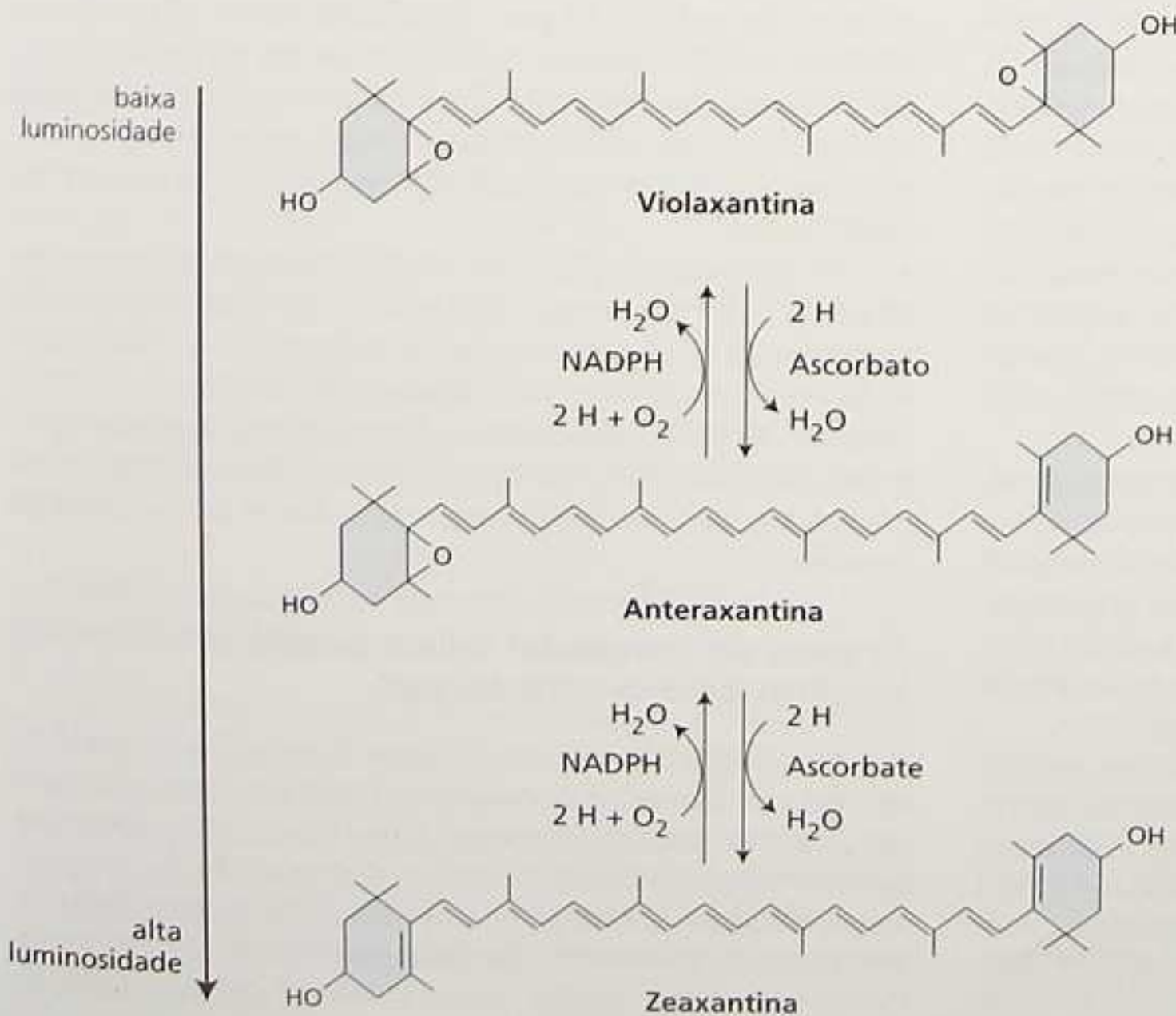
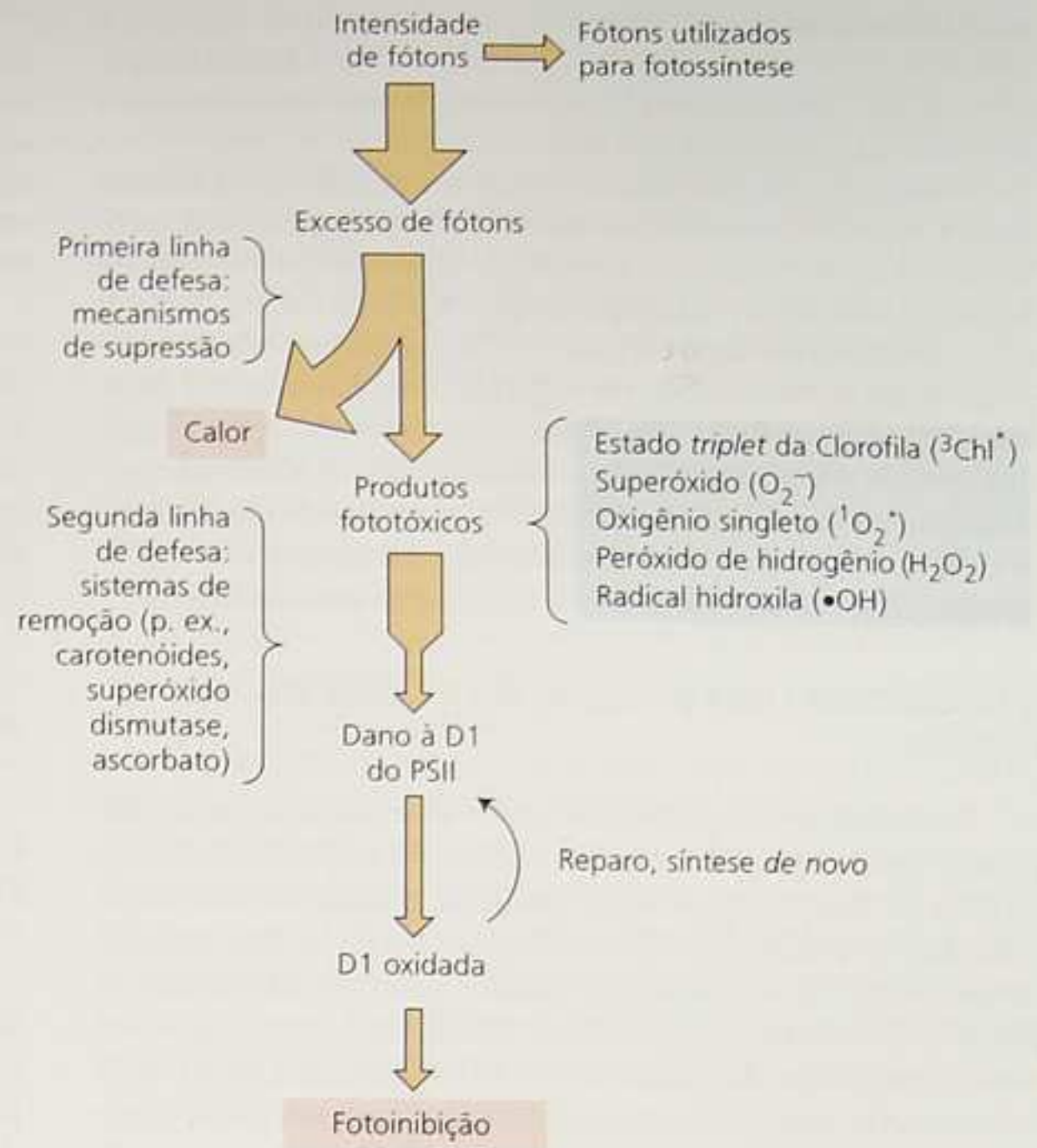



FIGURA 7.36 Estrutura química da violaxantina, anteraxantina e zeaxantina. O estado altamente inibido do fotossistema II está associado à zeaxantina; o estado não-inibido, à violaxantina. Enzimas interconvertem esses dois carotenóides, tendo a anteraxantina como intermediário, em resposta a alterações nas condições ambientais, em especial às condições de intensidade luminosa. A formação da zeaxantina utiliza o ascorbato como cofator e a formação da violaxantina requer NADPH (segundo Pfundel e Bilger, 1994).

excesso de excitação que chega ao centro de reação do PSII leva à sua inativação e ao seu dano (Long e cols., 1994). A **fotoinibição** é um conjunto complexo de processos moleculares, definidos como a inibição da fotossíntese por luz em excesso.

Conforme será discutido em detalhes no Capítulo 9, a fotoinibição é reversível nos estágios iniciais. Entretanto, a inibição prolongada resulta em dano ao sistema, de tal modo que o centro de reação do PSII precisa ser desmontado e reparado (Melis, 1999). O alvo principal desse dano é a proteína D1 que faz parte do complexo do centro de reação PSII (ver Figura 7.24). Quando a D1 é danificada pelo excesso de luz, ela necessita ser removida da membrana e substituída por uma molécula recém-sintetizada. Os demais componentes do centro de reação PSII não são danificados pelo excesso de luz, acreditando-se que sejam reciclados, de modo que a proteína D1 é o único componente que precisa ser sintetizado.

O fotossistema I está protegido das espécies ativas de oxigênio

O fotossistema I é particularmente vulnerável aos danos provocados pelas espécies ativas de oxigênio. O aceptor ferredoxina do PSI é um redutor muito forte, que pode reduzir com facilidade o oxigênio molecular para formar superóxido (O_2^-). Essa redução compete com a canalização normal dos elétrons para reduzir o $NADP^+$ e os demais. O superóxido é um de uma série de espécies ativas de oxigênio que podem ser muito prejudiciais a membranas biológicas. Os superóxidos assim formados são passíveis de eliminação pela ação de uma série de enzimas, incluindo superóxido dismutase e ascorbato peroxidase (Asada, 1999).

O empilhamento dos tilacóides permite a partição de energia entre os fotossistemas

O fato de a fotossíntese nas plantas superiores ser operada por dois fotossistemas com diferentes propriedades de absorção de luz provoca um problema especial. Se a taxa de envio da energia ao PSI e PSII não é igualada com precisão, e se as condições são tais que a taxa de fotossíntese é limitada pela disponibilidade de luz (baixa intensidade luminosa), a taxa de fluxo de elétrons será limitada pelo fotossistema que esteja recebendo a menor quantidade de energia. Na situação mais eficiente, a entrada de energia seria igual para os dois fotossistemas. Entretanto, não existe um arranjo de pigmentos que possa satisfazer essa exigência, pois em diferentes horas do dia a intensidade luminosa e a distribuição espectral tendem a favorecer um ou outro fototssistema (Trissl e Wilhelm, 1993; Allen e Forsberg, 2001).

O problema pode ser solucionado por um mecanismo que altere a distribuição de energia de um fotossistema para outro, em resposta a diferentes condições. Tal mecanismo de regulação já foi demonstrado em operação sob diferentes condições experimentais. A observação de que a produtividade quântica total da fotossíntese é quase independente do comprimento de onda (ver Figura 7.12) sugere fortemente a existência desse mecanismo.

As membranas dos tilacóides contêm uma quinase protéica que pode fosforilar um resíduo específico de treonina na superfície do LHCII, um dos pigmentos protéicos antena ligados à membrana já descritos neste capítulo (ver Figura 7.20). Quando o LHCII não está fosforilado, ele envia mais energia ao fotossistema II; quando está fosforilado, remete mais energia ao fotossistema I (Haldrup e cols., 2001).

A quinase é ativada quando a plastoquinona, um dos transportadores de elétrons entre PSI e PSII, acumula no estado reduzido. A plastoquinona reduzida acumula-se quando o PSII está sendo ativado com maior freqüência do que o PSI. O LHCII fosforilado migra, então, da região empilhada da membrana para a região não-empilhada (ver Figura 7.18), provavelmente devido a interações repulsivas com as cargas negativas nas membranas adjacentes.

A migração lateral do LHCII altera o balanço de energia em direção ao fotossistema I, localizado nas lamelas estromais, e para longe do fotossistema II, situado nas membranas empilhadas dos grana. Essa situação é chamada de *estado 2*. Se a plastoquinona tornar-se mais oxidada em função do excesso de excitação do fotossistema I, a quinase é desativada e o nível de fosforilação do LHCII, reduzido pela ação de uma fosfatase ligada à membrana. O LHCII move-se, então, de volta ao grana e o sistema está no *estado 1*. O resultado líquido é um controle muito preciso da distribuição de energia entre os fotossistemas, permitindo o uso mais eficiente da energia disponível.

GENÉTICA, MONTAGEM E EVOLUÇÃO DOS SISTEMAS FOTOSSINTÉTICOS

Os cloroplastos possuem seu próprio DNA, mRNA e maquinaria para a síntese de proteínas, porém algumas proteínas são codificadas por genes nucleares e importadas para os cloroplastos. Nesta seção, serão consideradas a genética, a montagem e a evolução dos principais componentes dos cloroplastos.

Genomas nucleares de cloroplastos e de cianobactérias já foram seqüenciados

O genoma completo dos cloroplastos de vários organismos já foi seqüenciado. O DNA do clorolpasto é circular e varia em tamanho de 120 a 160 quilobases. O genoma do cloroplasto contém seqüências de codificação para aproximadamente 120 proteínas. Algumas dessas seqüências de DNA codificam proteínas que ainda não foram caracterizadas. Não está claro se todos esses genes são transcritos em mRNA e traduzidos em proteínas, mas parece certo que algumas proteínas do cloroplasto ainda necessitam ser identificadas.

Os genomas completos da cianobactéria *Synechocystis* (cepa PCC 6803) e da planta superior *Arabidopsis* já foram seqüenciados e os genomas de importantes plantas cultivadas, tais como arroz e milho, completados (Kotani e Tabata, 1998; Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Dados genômicos, tanto para os cloroplastos quanto para o DNA nuclear, vão fornecer novos pontos de vista para os mecanismos da fotossíntese, assim como muitos outros processos vegetais.

Os genes dos cloroplastos exibem padrões de hereditariedade não-mendelianos

Os cloroplastos e as mitocôndrias reproduzem-se por divisão, em vez de **síntese *de novo***. Esse modo de reprodução não é uma surpresa, pois tais organelas contêm informação genética que não se encontra no núcleo. Durante a divisão celular, os cloroplastos são divididos entre a duas células-filhas. Na maioria das plantas sexuadas, entretanto, apenas a planta-mãe contribui com cloroplastos para o zigoto. Nessas plantas, o padrão normal de

herança mendeliana não se aplica aos genes codificados no cloroplasto, porque a prole recebe cloroplastos de apenas um dos pais. O resultado é uma herança **não-mendeliana** ou **materna**. Várias características são herdadas assim; um exemplo é a característica de resistência a herbicidas discutida no **Tópico 7.10 na Internet**.

Muitas proteínas dos cloroplastos são importadas do citoplasma

As proteínas do cloroplasto podem ser codificadas tanto pelo DNA do cloroplasto quanto pelo do núcleo. As proteínas codificadas no cloroplasto são sintetizadas em ribossomos do cloroplasto; as codificadas no núcleo o são em ribossomos citoplastmáticos e daí transportadas para os cloroplastos. Muitos dos genes nucleares contêm *íntrons* — que são seqüências de bases que não codificam para proteínas. O mRNA é processado para remover os *íntrons* e as proteínas são, então, sintetizadas no citoplasma.

Os genes necessários para o funcionamento do cloroplasto estão distribuídos no núcleo e no genoma do cloroplasto; eles não têm um padrão definido, porém ambos os conjuntos são essenciais para a viabilidade do cloroplasto. Alguns genes do cloroplasto são necessários para outras funções celulares, tais como a síntese de lipídeos e de heme. O controle da expressão dos genes nucleares que codificam para as proteínas do cloroplastos é complexo, envolvendo regulação dependente da luz mediada pelo fitocromo (ver Capítulo 17) e pela luz azul (ver Capítulo 18), bem como outros fatores (Bruick e Mayfield, 1999; Wollman e cols., 1999).

O transporte das proteínas do cloroplasto sintetizadas no citoplasma constitui-se em um processo rigidamente regulado (Chen e Schnell, 1999). Por exemplo, a enzima rubisco (ver Capítulo 8), que funciona no processo de fixação do carbono, tem dois tipos de subunidades: uma grande, codificada no cloroplasto, e outra pequena, codificada no núcleo. As subunidades pequenas da rubisco são sintetizadas no citoplasma e transportadas para o cloroplasto, onde a enzima será montada.

Neste e em outros casos conhecidos, as proteínas do cloroplastos codificadas no núcleo são sintetizadas como proteínas precursoras, contendo uma seqüência de aminoácidos *N*-terminal conhecida como **peptídeo de trânsito**. Essa seqüência terminal conduz a proteína precursora até o cloroplasto, facilita a sua passagem pelas membranas externa e interna, sendo, então, eliminada. O transportador de elétrons plastocianina é uma proteína hidrossolúvel codificada no núcleo, porém atuante no lume do cloroplasto. Portanto, ela necessita atravessar três membranas para alcançar seu destino no lume. O peptídeo de trânsito da plastocianina é muito grande e seu processamento ocorre em mais de um passo.

A biossíntese e a quebra das clorofilas são rotas metabólicas complexas

As clorofilas são moléculas complexas especialmente ajustadas para as funções de absorção de luz, transferência de energia e transferência de elétrons que realizam durante a fotossíntese (ver Figura 7.6). Como outras moléculas biológicas, as clorofilas são construídas por uma rota de síntese em que se empregam moléculas simples para a montagem de moléculas complexas (Porra, 1997; Beale, 1999). Cada etapa na rota de síntese é catalisada enzimaticamente.

A rota de síntese das clorofilas consiste de mais de uma dúzia de etapas (ver **Tópico 7.11 na Internet**). O processo pode ser dividido em várias fases (Figura 7.37), podendo cada uma ser considerada isoladamente, porém na célula são altamente coordenadas e reguladas. Essa regulagem é essencial, pois a clorofila, quando livre, e muitos dos intermediários biossintéticos são prejudiciais aos componentes celulares. O dano pode ser grande, pois as clorofilas absorvem a luz eficientemente, porém, na ausência das outras proteínas do sistema de transporte, elas não possuem a rota para liberar a energia, resultando na formação de *singletos* de oxigênio tóxicos.

A rota de quebra das clorofilas em folhas senescentes é bastante diferente da rota de síntese (Maile e cols., 1996). A primeira etapa é a remoção da cauda de fitol por uma enzima conhecida como clorofilase, seguida pela remoção do magnésio pela magnésio dequelatase. Em seguida, a estrutura de porfirina é aberta por uma enzima oxigenase (dependente de oxigênio), formando um tetrapirrol de cadeia aberta.

O tetrapirrol é, então, modificado para formar produtos hidrossolúveis e incolores. Tais metabólitos incolores são exportados do cloroplasto senescente e transportados para o vacúolo, onde são permanentemente armazenados. Os metabólitos da clorofila não são mais processados ou reciclados, embora as proteínas associadas a eles no cloroplasto sejam recicladas subseqüentemente para novas proteínas. Acredita-se que a reciclagem das proteínas seja importante para a economia de nitrogênio pela planta.

Os organismos fotossintetizantes complexos evoluíram a partir de formas mais simples

O complexo aparato fotossintético encontrado na plantas e algas é o resultado de uma longa seqüência evolutiva. Muito pode ser compreendido sobre esse processo evolutivo por meio da análise de organismos fotossintetizantes procariontes mais simples, incluindo as bactérias anoxigênicas e as cianobactérias.

O cloroplasto constitui-se em uma organela celular semi-autônoma, com o seu próprio DNA e um aparato completo para a síntese de proteínas. Muitas das proteínas que compõem o aparato fotossintético, além das clorofilas e dos lipídeos, são sintetizadas no próprio cloroplasto. Outras são importadas do citoplasma e codificadas por genes nucleares. Como aconteceu essa curiosa divisão de trabalho? Muitos especialistas hoje concordam que o cloroplasto descende de uma relação simbiótica entre uma cianobactéria e uma simples célula eucarionte não-fotossintetizante, relacionamento este chamado de **endossimbiose** (Cavalier-Smith, 2000).

Originalmente, as cianobactérias eram capazes de viver independentemente, mas, com o passar do tempo, muita da sua informação genética necessária para o funcionamento celular normal perdeu-se, sendo transferida para o núcleo uma considerável quantidade de informação necessária para sintetizar o aparato fotossintético. Assim, o cloroplasto não pôde mais viver fora do seu hospedeiro e, por fim, tornou-se parte integral da célula.

Acredita-se que, em alguns tipos de algas, os cloroplastos surgiram por endossimbiose de organismos eucariontes fotossintetizantes (Palmer e Delwiche, 1996). Nesses organismos, o cloroplasto é delimitado por três e, em alguns casos, por quatro membranas, que se acredita sejam resquícios das membranas plasmáticas dos organismos precursores. As mitocôndrias são igualmente tidas como originadas por endossimbiose em um evento separado, muito antes da formação dos cloroplastos.

Fase I

Ácido glutâmico

Ácido 5-aminolevulínico (ALA)

Profobilinogênio (PBG)

Fase II

Protoporfirina IX

Mg^{2+}

Protoclorofilídeo *a* monovinílico

Sítio de redução

NADPH, luz

Protoclorofilídeo oxirredutase

Fase III

Clorofilídeo *a*

Fase IV

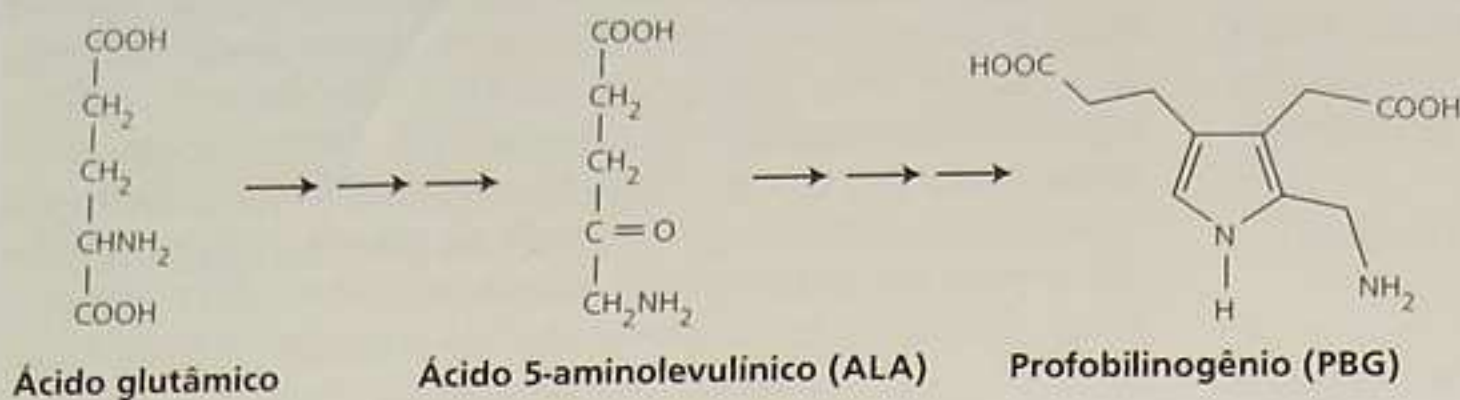
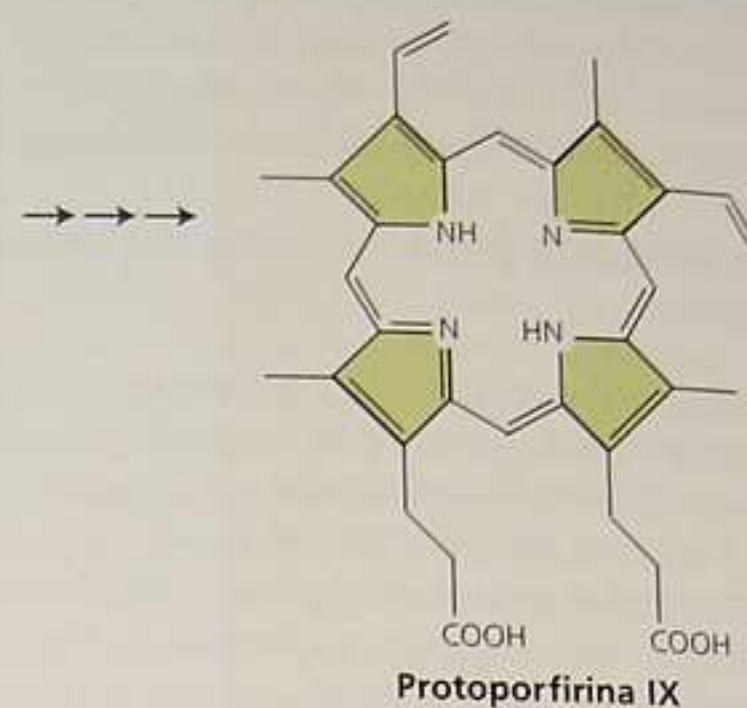
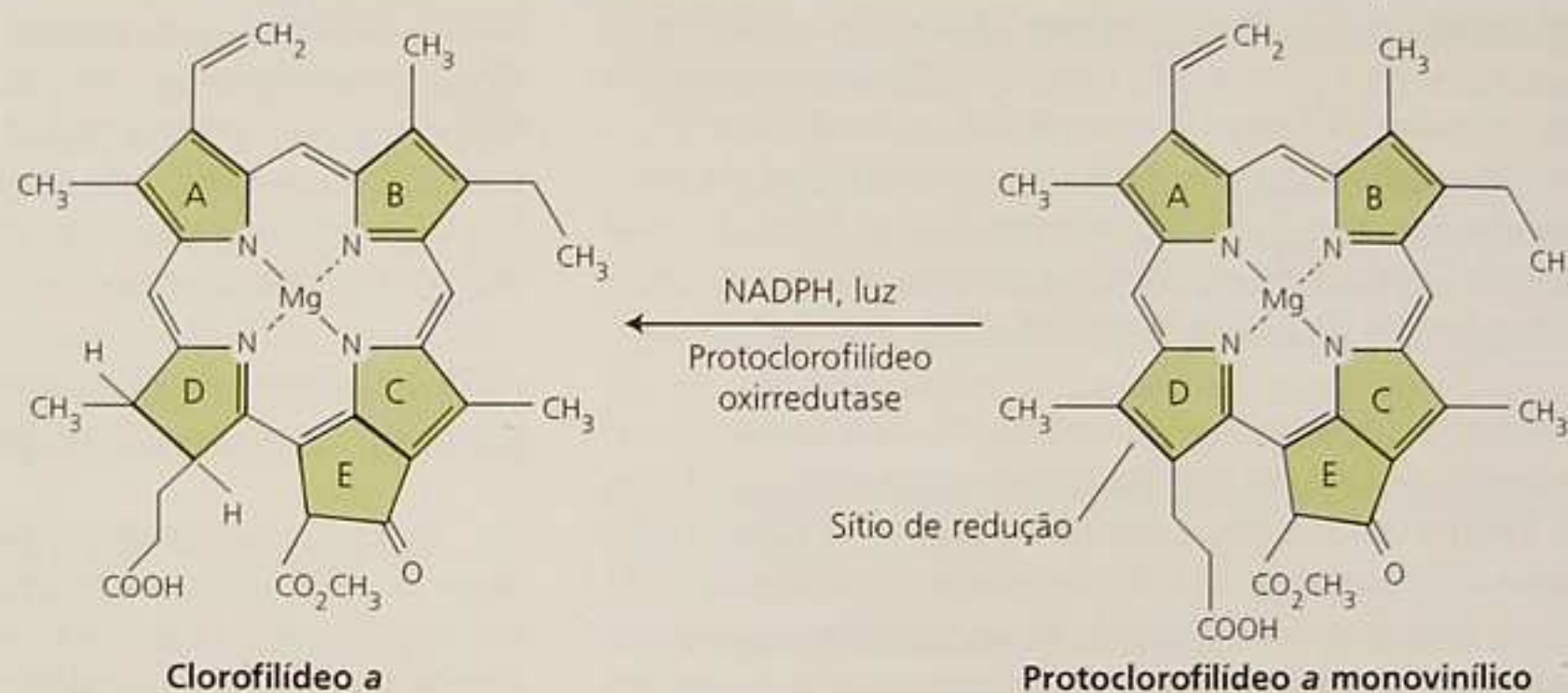
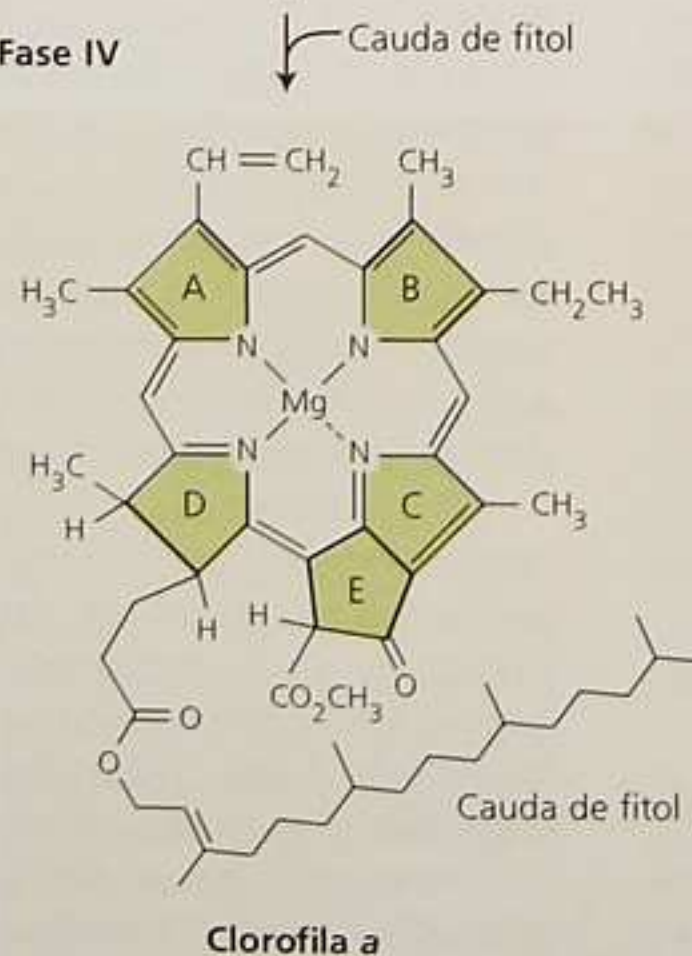
Cauda de fitol

Clorofila *a*

FIGURA 7.37 A rota biossintética da clorofila. A rota inicia com o ácido glutâmico, que é convertido a ácido 5-aminolevulínico (ALA). Duas moléculas de ALA são condensadas para formar porfobilinogênio (PBG). Quatro moléculas de PBG são ligadas para a formação da protoporfirina IX. O magnésio (Mg) é, então, inserido e a ciclização dependente de luz do anel E, a redução do anel D e a ligação da cauda de fitol completam o processo. Muitas etapas do processo estão omitidas nesta figura.

As respostas para outras questões relacionadas com a evolução da fotossíntese são menos claras, incluindo a natureza dos sistemas fotossintéticos primários, como os dois fotossistemas tornaram-se ligados e a origem evolutiva do complexo de liberação do oxigênio (Blakenship e Hartman, 1998; Xiong e cols., 2000).

RESUMO

A fotossíntese é o armazenamento de energia solar realizado pelas plantas, algas e bactérias fotossintetizantes. Os fótons absorvidos excitam moléculas de clorofila, que, excitadas, liberam essa energia como calor, fluorescência, transferência de energia ou fotoquímica. A luz é absorvida sobretudo pelos complexos antena, os quais são compostos por clorofilas, pigmentos acessórios e proteínas, estando localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos.

Os pigmentos antena transferem a energia para um complexo clorofila-proteína especializado, conhecido como centro de reação, o qual contém complexos protéicos com muitas subunidades e centenas ou, em alguns organismos, milhares de clorofilas. Os complexos antena e os centros de reação são componentes integrais das membranas dos tilacóides. Os centros de reação iniciam uma série de reações químicas complexas que capturam energia na forma de ligações químicas.

A relação entre a quantidade de *quanta* absorvidos e a produção de produtos fotoquímicos em uma reação dependente da luz é dada pela produtividade quântica. A produtividade quântica das etapas iniciais da fotossíntese é de aproximadamente 0,95, indicando que a quase totalidade dos fótons absorvidos produz separação de cargas nos centros de reação.

As plantas e alguns procariontes fotossintetizantes possuem dois centros de reação: fotossistema I e II, que funcionam em série. Ambos os fotossistemas estão separados no espaço: o PSI é encontrado exclusivamente nas membranas não-empilhadas, enquanto o PSII nas membranas granais. As clorofilas do centro de reação PSI apresentam o máximo de absorção a 700 nm e as do PSII, a 680 nm. Os fotossistemas II e I realizam o transporte acíclico de elétrons, oxidam a água a oxigênio molecular e reduzem o $NADP^+$ a NADPH. Energeticamente é muito difícil oxidar a água para formar oxigênio molecular, e o sistema fotossintético de liberação de oxigênio é o único sistema bioquímico capaz de oxidar a água, fornecendo, assim, a quase totalidade do oxigênio na atmosfera terrestre. A fotoxidação da água é modelada pelo mecanismo de cinco etapas dos estados S. O manganês é um co-fator essencial no processo de oxidação da água e os cinco estados S parecem representar sucessivos estados oxidados de uma enzima portadora de manganês.

O resíduo de tirosina da proteína D1 do centro de reação PSII funciona como um transportador de elétrons entre o complexo de liberação de oxigênio e o P680. A feofitina e duas plastoquinonas são os transportadores entre o P680 e o grande complexo citocromo b_6f. A plastocianina é o transportador entre o citocromo b_6f e P700. Os transportadores de elétrons do P700 são agentes redutores muito fortes e incluem uma quinona e três proteínas ferro-sulfurosas ligadas à membrana, conhecidas como ferredoxinas. O fluxo de elétrons termina com a redução do $NADP^+$ à NADPH por uma ferredoxina-NADP redutase ligada à membrana.

Uma porção da energia dos fótons é também armazenada inicialmente como energia química potencial, em grande parte na forma de uma diferença de pH entre os dois lados da membrana dos tilacóides. Essa energia é rapidamente convertida em energia química durante a formação do ATP, pela ação de um complexo enzimático conhecido como ATP sintase. A fotofosforilação do ADP pela ATP sintase é operada por um mecanismo quimiosmótico. O fluxo de fotossintético de elétrons está associado à translocação de prótons pela membrana do tilacóide e o estroma torna-se mais alcalino, enquanto o lume, mais ácido. Esse gradiente de prótons impulsiona a síntese de ATP com uma estequiomeria de quatro íons H^+ por ATP. O NADPH e o ATP formados durante as reações luminosas fornecem energia para a redução do carbono.

Excesso de energia luminosa pode ser prejudicial aos sistemas fotossintéticos, mas vários mecanismos minimizam estes danos. Os carotenóides trabalham rapidamente como agentes protetores, reduzindo os estados excitados da clorofila. As alterações no estado fosforilado dos pigmentos protéicos das antenas podem modificar a distribuição de energia entre os fotossistemas I e II, quando há um desequilíbrio entre as energias absorvidas pelos fotossistemas. O ciclo das xantofilas também contribui para a dissipação do excesso de energia pelo *quenching* não-fotoquímico.

Os cloroplastos contêm DNA, codificando e sintetizando algumas das proteínas essenciais para a fotossíntese. As proteínas adicionais são codificadas pelo DNA nuclear, sintetizadas no citosol e importadas pelo cloroplasto. As clorofilas, por sua vez, são sintetizadas em uma rota biossintética envolvendo mais de uma dúzia de etapas, cada uma delas regulada cuidadosamente. Uma vez sintetizadas, as proteínas e os pigmentos são montados dentro das membranas dos tilacóides.

Material da Internet

Tópicos da Internet

7.1 Princípios de espectrofotometria
A espectroscopia é uma técnica-chave no estudo das reações luminosas.

7.2 A distribuição das clorofilas e outros pigmentos fotossintéticos
O conteúdo de clorofilas e outros pigmentos fotossintéticos varia entre os reinos vegetais.

7.3 Produtividade quântica
A produtividade quântica mede o quão eficientemente a luz impulsiona os processos fotobiológicos.

7.4 Efeitos antagônicos da luz na oxidação dos citocromos
Os fotossistemas I e II foram descobertos por alguns experimentos geniais.

7.5 **Estrutura de dois centros de reação bacteriais**
Estudos de difração de raios X mostraram a estrutura atômica do centro de reação do fotossistema II.

7.6 **Potenciais médios e reações redox**
A medição dos potenciais médios é útil para a análise do fluxo de elétrons através do fotossistema II.

7.7 **Liberação de oxigênio**
O mecanismo dos estados S é um modelo valioso para a quebra da água no PSII.

7.8 **Fotossistema I**
O centro de reação PSI é um complexo multiprotéico.

7.9 **ATP sintase**
A ATP sintase funciona como um motor molecular.

7.10 **Modo de ação de alguns herbicidas**
Alguns herbicidas matam as plantas bloqueando o fluxo de elétrons da fotossíntese.

7.11 **Biossíntese da clorofila**
Clorofilas e heme partilham os passos iniciais da suas rotas biossintéticas.

Ensaio da Internet

7.1 **Uma nova visão da estrutura dos cloroplastos**
Stromules estendem o alcance dos cloroplastos.

Referências bibliográficas

Allen, J. F., and Forsberg, J. (2001) Molecular recognition in thylakoid structure and function. *Trends Plant Sci.* 6: 317-326.

Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana.* Nature 408: 796-815.

Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 601-639.

Avers C. J. (1985) *Molecular Cell Biology.* Addison-Wesley, Reading, MA.

Barber, J., Nield, N., Morris, E. P, and Hankamer, B. (1999) Subunit positioning in photosystem II revisited. *Trends Biochem. Sci.* 24: 43-15.

Beale, S. I. (1999) Enzymes of chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* 60:43-73.

Becker, W. M. (1986) *The World of the Cell.* Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA.

Berry E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L.-S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome be complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69:1005-1075.

Blankenship, R. E. (2002) *Molecular Mechanisms of Photosynthesis.* Blackwell Science, Oxford.

Blankenship, R. E., and Hartman, H. (1998) The origin and evolution of oxygenic photosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* 23: 94-97.

Blankenship, R. E., and Prince, R. C. (1985) Excited-state redox potentials and the Z scheme of photosynthesis. *Trends Biochem.* Sci. 10:,382-383.

Boyer, P D. (1997) The ATP synthase: A splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717-749.

Brettel, K. (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta* 1318: 322-373.

Bruick, R. K., and Mayfield, S. P (1999) Light-activated translation of chloroplast mRNAs. *Trends Plant Sci.* 4: 190-195.

Buchanan, B. B., Gruissem., W., and Jones, R. L., eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants.* Amer. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD.

Cavalier-Smith T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5: 174-182.

Chen, X., and Schnell, D. J. (1999) Protein import into chloroplasts. *Trends Cell Biol.* 9: 222-227.

Chitnis, P R. (2001) Photosystem I: Function and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 593-626.

Cramer, W. A., Soriano, G. M., Ponomarev, M., Huang, D., Zhang, H., Martinez, S. E., and Smith, J. L. (1996) Some new structural aspects and old controversies concerning the cytochrome *b, f* complex of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:477-508.

Deisenhofer, J., and Michel, H. (1989) The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis. Science* 245: 1463-1473.

Demmig-Adams, B., and Adams, W. W.,111. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 599-626.

Green, B. R., and Durnford, D. G. (1996) The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 685-714.

Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E., and Kehoe, D. M. (1995) Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: Diversity, control, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 29: 231-288.

Haldrup, A., Jensen, E E., Lunde, C., and Scheller, H. V (2001) Balance of power: A view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant* Sci. 6: 301-305.

Haraux, E, and De Kouchkovsky, Y (1998) Energy coupling and ATP synthase. *Photosynth. Res.* 57: 231-251.

Hoganson, C. W., and Babcock, G. T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis. *Science* 277: 1953-1956.

Horton, P, Ruban, A. V, and Walters, R. G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 655-684.

Jordan, P., Fromme, P, Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411: 909-917.

Karplus, P A., Daniels, M. J., and Herriott, J. R. (1991) Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: Prototype for a structurally novel flavoenzyme family. *Science* 251: 60-66.

Kotani, H., and Tabata, S. (1998) Lessons from sequencing of the genome of a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis sp.* PCC6803. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:151-171.

Krause, G. H., and Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-350.

Kizhlbrandt, W., Wang, D. N., and Fujiyoshi, Y (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature* 367: 614-621.

Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S., and Niyogi, K. K. (2000) A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* 403: 391-395.

Long, S. P., Humphries, S., and Falkowski, P G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-662.

Matile, P., Hbrtensteiner, S., Thomas, H., and Krautler, B. (1996) Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiol.* 112: 1403-1409.

Melis, A. (1999) Photosystem-II damage and repair cycle in cldoroplasts: What modulates the rate of photodamage in vivo? *Trends Plant Sci.* 4:130-135.

Mizller, P., Li, X.-P., and Niyogi, K. K. (2001) Non-photochemical quenching: A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125: 1558-1566.

Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Graige, M. S., and Feher, G. (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers. *Biochim. Biophys. Acta* 1458: 148-163.

Palmer, J. D., and Delwiche, C. E (1996) Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. *Proc. Nall. Acad. Sci. USA* 93: 7432-7435.

Paulsen, H. (1995) Chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Photochem. Photobiol.* 62: 367-382.

Capítulo

8 Fotossíntese: reações de carboxilação

NO CAPÍTULO 5 FORAM DISCUTIDAS as exigências das plantas em nutrientes minerais e luz necessários para crescer e completar o seu ciclo de vida. Os nutrientes minerais ciclam pela biosfera, devido à alta interação dos organismos vivos entre si e com o seu ambiente. Tais ciclos envolvem interações complexas e cada um é crítico em sua própria forma. Pelo fato de a quantidade de matéria na biosfera permanecer constante, é necessário um suprimento de energia para manter tais ciclos operacionais. De outra forma, o aumento da entropia indica que o fluxo de matéria viria, em última analise, a parar.

Os organismos autotróficos possuem a capacidade de converter as fontes físicas e químicas de energia em carboidratos na ausência de substratos orgânicos. A maior parte da energia externa é consumida na transformação do CO_2 em um estado reduzido que seja compatível com as necessidades da célula (—CHOH—).

Estimativas recentes indicam que aproximadamente 200 bilhões de toneladas de CO_2 são convertidas em biomassa a cada ano. Aproximadamente 40% dessa massa é originada das atividades do fitoplâncton marinho. A maior parte do carbono é incorporada em compostos orgânicos pelas reações de redução do carbono associadas com a fotossíntese.

No Capítulo 7, viu-se como a oxidação fotoquímica da água a oxigênio molecular está ligada à geração do ATP e do nucleotídeo reduzido de piridina (NADPH), pelas reações que ocorrem na membrana dos tilacóides dos cloroplastos. As reações que catalisam a redução do CO_2 a carboidratos estão ligadas ao consumo de NADPH e ATP pelas enzimas que se encontram no estroma, a fase solúvel dos cloroplastos.

Por muito tempo imaginou-se que tais reações do estroma fossem independentes da luz e, em conseqüência, foram referidas como *reações escuras* (do inglês, *dark reactions*). Entretanto, por serem essas reações, que se localizam no estroma, dependentes dos produtos dos processos fotoquímicos e também reguladas diretamente pela luz, elas são mais propriamente chamadas de *reações de carboxilação da fotossíntese.*

Neste capítulo, serão examinadas as reações cíclicas que realizam a fixação e a redução do CO_2, e, então, considerar-se-á como o fenômeno da fotorrespiração, catalisado pela enzima de carboxilação, altera a eficiência da fotossíntese. Este capítulo descreverá também os mecanismos bioquímicos para concentrar o dióxido de carbono, o qual permite às plantas mitigar os impactos da fotorrespiração: bombas de CO_2, metabolismo C_4 e metabolismo ácido das

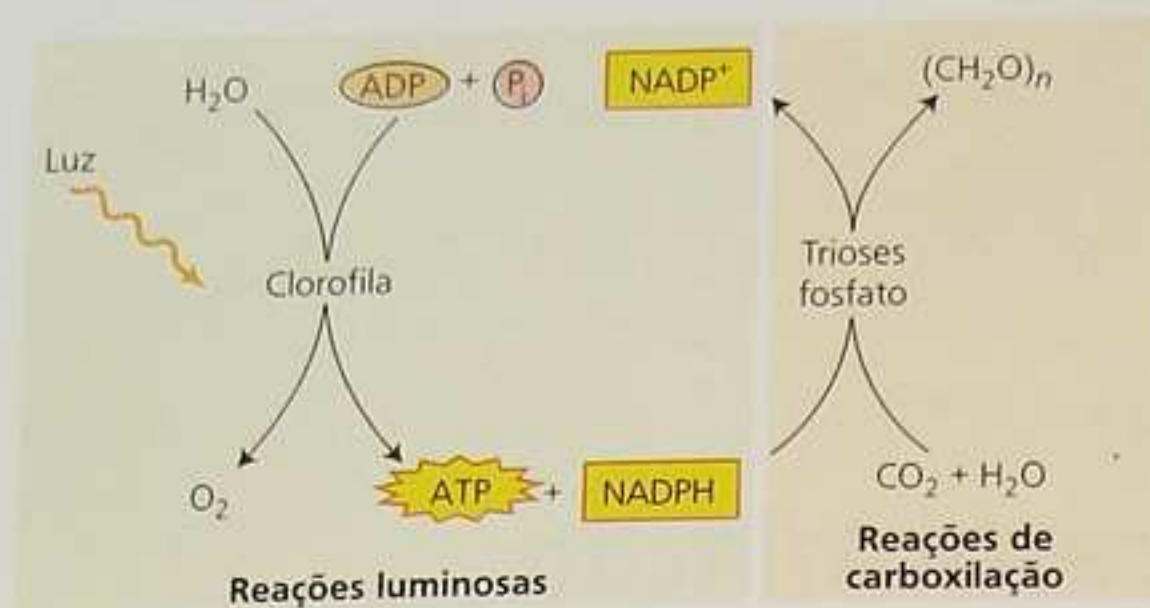



FIGURA 8.1 Reações luminosas e de carboxilação da fotossíntese. A luz é requerida para a geração do ATP e NADPH. O ATP e o NADPH são consumidos pelas reações de carboxilação, as quais reduzem o CO_2 a carboidratos (triose fosfato).

crassuláceas (CAM). Na conclusão do capítulo será apresentada uma consideração a respeito da síntese da sacarose e do amido.

O CICLO DE CALVIN

Todos os eucariontes fotossintetizantes, da alga mais primitiva até a angiosperma mais avançada, reduzem o CO_2 a carboidratos pelo mesmo mecanismo básico: o ciclo fotossintético de redução do carbono, originalmente descrito para as espécies C_3 (o **ciclo de Calvin**, ou **ciclo redutivo das pentoses fosfato [RPP]**). Outras rotas metabólicas associadas com a fixação fotossintética do CO_2, tal como o ciclo fotossintético C_4 de assimilação do carbono, são auxiliares ou dependentes do ciclo de Calvin.

Nesta seção, examina-se como o CO_2 é fixado pelo ciclo de Calvin através do uso do ATP e NADPH gerados pelas reações luminosas (Figura 8.1) e como o ciclo é regulado.

O ciclo de Calvin possui três fases: carboxilação, redução e regeneração

O ciclo de Calvin foi elucidado como resultado de uma série de experimentos realizados por Melvin Calvin e seus colaboradores na década de 1950, pelos quais recebeu o Prêmio Nobel em 1961 (ver **Tópico 8.1 na Internet**). No ciclo de Calvin, CO_2 e água do ambiente são combinados enzimaticamente com uma molécula aceptora contendo cinco átomos de carbono, para gerar duas moléculas de um intermediário com três carbonos. Esse intermediário (3-fosfoglicerato) é reduzido a carboidrato, utilizando o ATP e o NADPH gerados fotoquimicamente. O ciclo é completado pela regeneração do aceptor de cinco carbonos (ribulose-1,5-bifosfato, abreviado RuBP).

O ciclo de Calvin acontece em três estágios (Figura 8.2):

1. *Carboxilação* do aceptor de CO_2, ribulose-1,5-bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, o primeiro intermediário estável do ciclo de Calvin.
2. *Redução* do 3-fosfoglicerato, formando gliceraldeído-3-fosfato, um carboidrato.
3. *Regeneração* do aceptor de CO_2, ribulose-1,5-bifosfato, a partir do gliceraldeído-3-fosfato.

O carbono presente no CO_2 é a forma mais oxidada que se encontra na natureza (+4). O carbono do primeiro intermediário estável, 3-fosfoglicerato, é mais reduzido (+3), sendo ainda mais reduzido no produto gliceraldeído-3-fosfato (+1). Em resumo, a reações iniciais do ciclo de Calvin completam a redução do carbono atmosférico, facilitando, assim, sua incorporação a compostos orgânicos.

A carboxilação da ribulose bifosfato é catalisada pela enzima rubisco

O CO_2 entra no ciclo de Calvin pela reação com a ribulose-1,5-bifosfato para produzir duas moléculas de 3-fosfoglicerato (Figura 8.3 e Tabela 8.1). Essa reação é catalisada pela enzima ribulose bifosfato carboxilase/oxigenase localizada no cloroplasto, também chamada de **rubisco** (ver **Tópico 8.2 na Internet**). Conforme indica seu nome completo, a enzima possui também uma atividade de oxigenase, na qual o O_2 compete com o CO_2 pelo substrato comum ribulose-1,5-bifosfato (Lorimer, 1983). Conforme será discutido mais tarde, essa propriedade limita a fixação líquida de CO_2.

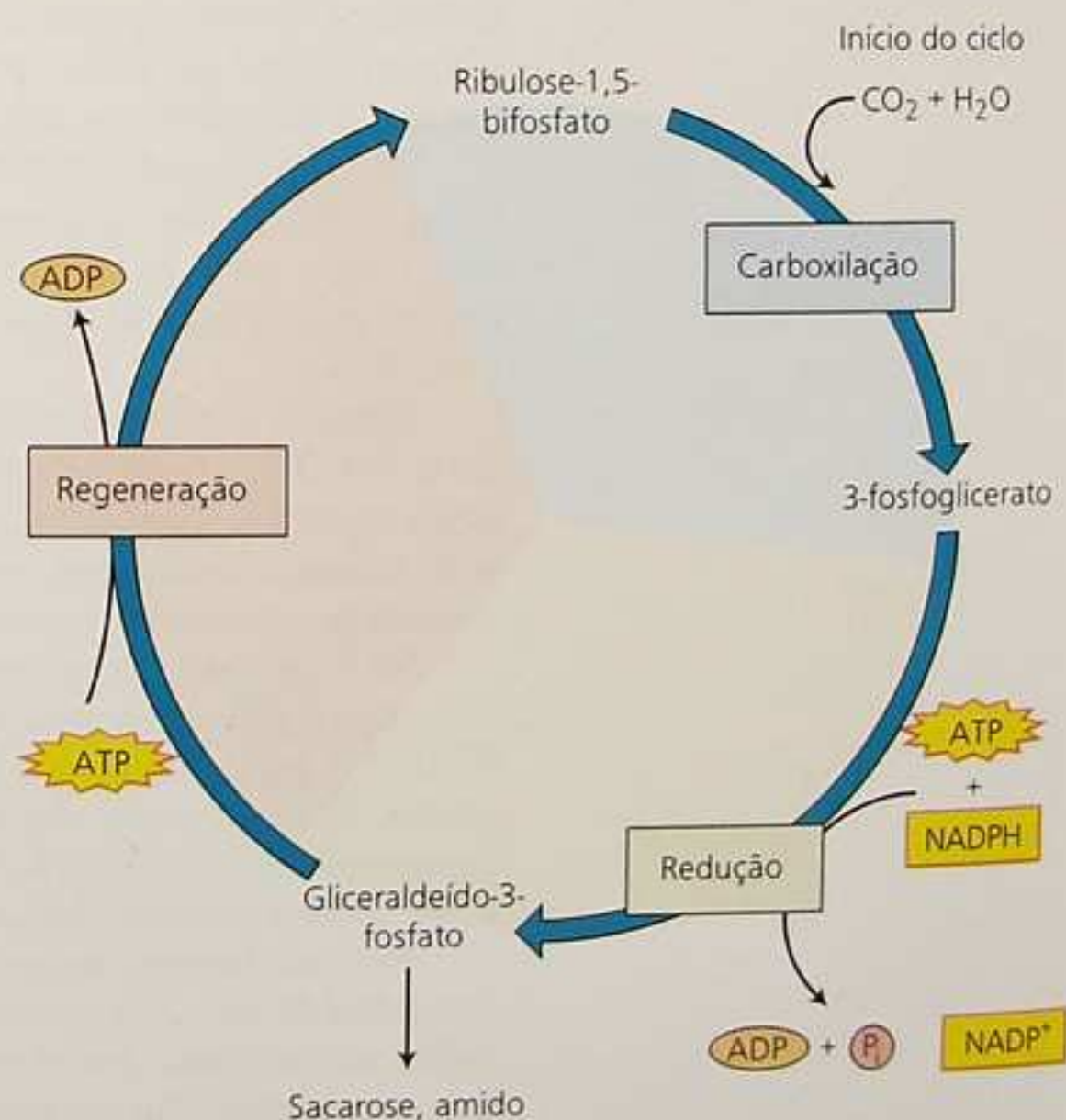



FIGURA 8.2 O ciclo de Calvin opera em três fases: (1) carboxilação, durante a qual o CO_2 é covalentemente ligado a um esqueleto de carbono, (2) redução, durante a qual o carboidrato é formado com gasto do ATP fotoquimicamente derivado e dos equivalentes redutores na forma de NADPH, e (3) regeneração, durante a qual o aceptor de CO_2, ribulose-1,5-bifosfato é reconstituído.

Ribulose-1,5-bifosfato

$3\ CO_2$ 3 H_2O 6 H^+

Rubisco

3-fosfoglicerato

6 ATP 6 ADP

Fosfoglicerato quinase

1,3-difosfoglicerato

6 NADPH + 6 H^+

6 $NADP^+$ + 6 P_i

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Triose fosfato G3P ⇌ DHAP

Gliceraldeído-3-fosfato

Triose fosfato isomerase

Diidroxi-acetona fosfato

Diidroxi-acetona fosfato

Aldolase

Frutose-1,6-bifosfato

P_i H_2O

Frutose-1,6-bifosfatase

Frutose-6-fosfato

Xilulose-5-fosfato

3 ADP

Fosforibuloquinase

3 ATP

Ribulose-5-fosfato 3-epimerase

Ribulose-5-fosfato

Transcetolase

Eritrose-4-fosfato

Aldolase

Sedo-heptulose-1,7-bifosfato

H_2O P_i

Sedo-heptulose-1,7-bifosfatase

Sedo-heptulose-7-fosfato

Ribulose-5-fosfato

Ribulose-5-fosfato 3-epimerase

Xilulose-5-fosfato

Ribose-5-fosfato

Ribulose 5-fosfato isomerase

Ribose-5-fosfato

Transcetolase

FIGURA 8.3 O ciclo de Calvin. A carboxilação de três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato leva à síntese *líquida* de uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e à regeneração das três moléculas do material inicial. O processo inicia e acaba com três moléculas de ribulose-1,5-bifosfato, refletindo a natureza cíclica desta rota.

TABELA 8.1
Reações do ciclo de Calvin

Enzima	Reação
1. Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase	6 Ribulose-1,5-bifosfato + 6 CO_2 +6 H_2O → 12 (3-fosfoglicerato) + 12 H^+
2. 3-Fosfoglicerato quinase	12 (3-Fosfoglicerato) + 12 ATP → 12 (1,3-bifosfoglicerato) + 12 ADP
3. NADP:gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	12(1,3-Bifosfoglicerato) + 12 NADPH + 12 H^+ → 12 gliceraldeído-3-fosfato + 12 $NADP^+$ + 12Pi
4. Triosefosfato isomerase	5 Gliceraldeído-3-fosfato → 5 diidroxiacetona-3-fosfato
5. Aldolase	3 Gliceraldeído-3-fosfato + 3 diidroxiacetona-3-fosfato → 3 frutose-1,6-bifosfato
6. Frutose-1,6-bifosfatase	3 Frutose-1,6-bifosfato + 3 H_2O → 3 frutose-6-fosfato + 3 P_i
7. Transcetolase	2 Frutose-6-fosfato + 2 gliceraldeído-3-fosfato → 2 eritrose-4-fosfato + 2 xilulose-5-fosfato
8. Aldolase	2 Eritrose-4-fosfato + 2 diidroxiacetona-3-fosfato → 2 Sedo-heptulose-1,7-bifosfato
9. Sedo-heptulose-1,7-bifosfatase	2 Sedo-heptulose-1,7-bifosfato + 2 H_2O → 2 sedo-heptulose-7-fosfato + 2 P_i
10. Transcetolase	2 Sedo-heptulose-7-fosfato + 2 gliceraldeído-3-fosfato → 2 ribose-5-fosfato + 2 xilulose-5-fosfato
11a. Ribulose-5-fosfato epimerase	4 Xilulose-5-fosfato → 4 ribulose-5-fosfato
11b. Ribose-5-fosfato isomerase	2 Ribose-5-fosfato → 2 ribulose-5-fosfato
12. Ribulose-5-fosfato quinase	6 Ribulose-5-fosfato + 6 ATP → 6 ribulose-1,5-bifosfato + 6 ADP + 6 H^+
Líquido: 6 CO_2 + 11 H_2O + 12 NADPH + 18 ATP → Frutose-6-fosfato + 12 $NADP^+$ + 6 H^+ + 18 ADP + 17 P_i	

Nota: P_i simboliza fosfato inorgânico.

Conforme exibe a Figura 8.4, o CO_2 é adicionado ao carbono 2 da ribulose-1,5-bifosfato, produzindo um intermediário instável, ligado à enzima, o qual é hidrolisado para produzir duas moléculas do produto estável 3-fosfoglicerato (ver Tabela 8.1, reação 1). As duas moléculas de 3-fosfoglicerato — denominadas superior e inferior na figura — são distinguidas pelo fato de a molécula superior conter o dióxido de carbono recém-incorporado, designado aqui de $^*CO_2$

Duas propriedades da reação da carboxilase são de especial importância:

1. A mudança negativa na energia livre (ver **Capítulo 2 na Internet**, para discussão sobre energia livre) associada com a carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato é grande; assim, a reação direta é fortemente favorecida.
2. A afinidade da rubisco pelo CO_2 é suficientemente alta para garantir uma rápida carboxilação nas condições de baixas concentrações de CO_2 encontradas nas células fotossintetizantes.

A rubisco é muito abundante, representando até 40% do total das proteínas solúveis na maioria das folhas. A concentração de sítios ativos da rubisco no estroma dos cloroplastos é estimada em aproximadamente 4m*M* ou cerca de 500 vezes maior do que a concentração de seu substrato CO_2 (ver **Tópico 8.3 na Internet**).

As trioses fosfato são formadas na etapa de redução do ciclo de Calvin

Na próxima etapa do ciclo de Calvin (Figura 8.3 e Tabela 8.1), o 3-fosfoglicerato formado no estágio de carboxilação passa por duas modificações:

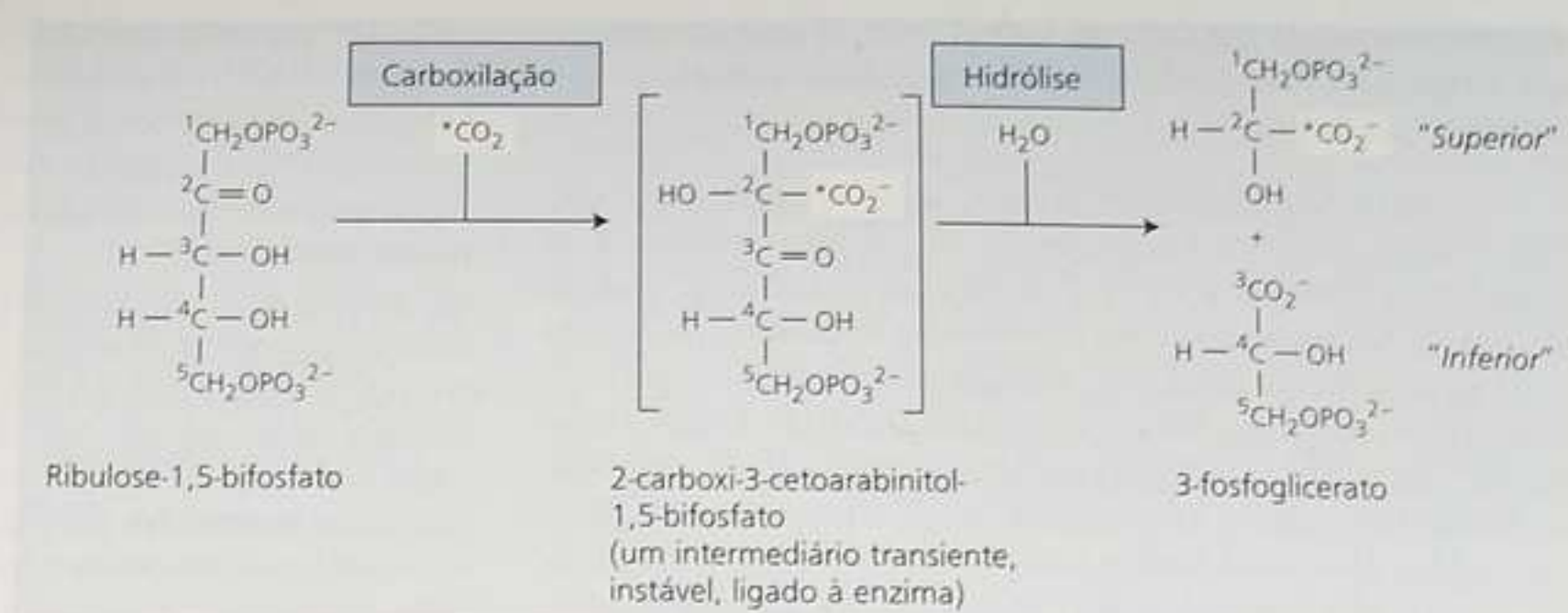
1. É primeiramente fosforilado, via 3-fosfoglicerato quinase, a 1,3-bifosfoglicerato, utilizando ATP gerado nas reações luminosas (Tabela 8.1, reação 2).
2. Em seguida, é reduzido a gliceraldeído-3-fosfato, utilizando o NADPH gerado pelas reações luminosas (Tabela 8.1, reação 3). A enzima NADP:gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase do cloroplasto catalisa esta etapa. Observe que a enzima é similar àquela da glicólise (a qual será discutida no Capítulo 11), exceto que o NADP, em vez de NAD, é a co-enzima. Uma forma da enzima ligada ao NADP é sintetizada durante o desenvolvimento do cloroplasto (*greening*) e esta é utilizada, preferencialmente, nas reações biossintéticas.

FIGURA 8.4 A carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato pela rubisco.

Carboxilação; $^{*}CO_2$; Hidrólise; H_2O

Ribulose-1,5-bifosfato

2-carboxi-3-cetoarabinitol-1,5-bifosfato (um intermediário transiente, instável, ligado à enzima)

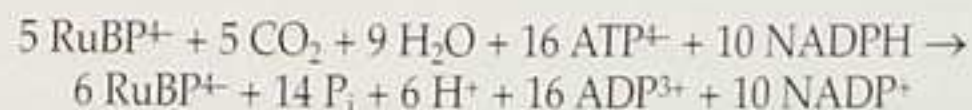
3-fosfoglicerato ("Superior" + "Inferior")

O funcionamento do ciclo de Calvin necessita da regeneração da ribulose-1,5-bifosfato

A absorção contínua de CO_2 exige que o aceptor de CO_2, ribulose-1,5-bifosfato, seja constantemente regenerado. Para impedir a redução de intermediários do ciclo de Calvin, três moléculas de ribulose-1,5-biosfato (15 carbonos no total) são formadas pelas reações que reorganizam os carbonos das cinco moléculas de triose fosfato ($5 \times 3 = 15$ carbonos). Essa reorganização consiste das reações 4 a 12 na Tabela 8.1 (ver também a Figura 8.3):

1. Uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato é convertida, via triose fosfato isomerase, a diidroxiacetona-3-fosfato em uma reação de isomerização (reação 4).
2. Diidroxiacetona-3-fosfato passa, então, por uma condensação aldólica com uma segunda molécula de gliceraldeído-3-fosfato, uma reação catalisada pela aldolase, gerando frutose-1,6-bifosfato (reação 5).
3. Frutose-1,6-bifosfato ocupa uma posição-chave no ciclo e é hidrolisada a frutose-6-fosfato (reação 6), a qual reage com a enzima transcetolase
4. Uma unidade de dois carbonos (C-1 e C-2 da frutose-6-fosfato) é transferida, via transcetolase, para uma terceira molécula de gliceraldeído-3-fosfato, gerando eritrose-4-fosfato (do C-3 a C-6 da rutose) e xilulose-5-fosfato (do C-2 da frutose e do gliceraldeído-3-fosfato) (reação 7).
5. Eritrose-4-fosfato combina, então, via aldolase, com uma quarta molécula de triose fosfato (diidroxiacetona-3-fosfato), para produzir o açúcar de sete carbonos sedo-heptulose-1,7-bifosfato (reação 8).
6. Este bifosfato de sete carbonos é, então, hidrolisado através de uma fosfatase específica, para gerar sedo-heptulose-7-fosfato (reação 9).
7. Sedo-heptulose-7-fosfato doa uma unidade de dois carbonos para a quinta (e última) molécula de gliceraldeído-3-fosfato via transcetolase e produz ribose-5-fosfato (do C-3 ao C-7 da sedo-heptulose) e xilulose-5-fosfato (do C-2 da sedo-heptulose e do gliceraldeído-3-fosfato) (reação 10).
8. As duas moléculas de xilulose-5-fosfato são convertidas a duas moléculas do açúcar ribulose-5-fosfato por uma ribulose-5-fosfato epimerase (reação 11a). A terceira molécula de ribulose-5-fosfato é formada da ribose-5-fosfato pela ribose-5-fosfato isomerase (reação 11b).
9. Por fim, a ribulose-5-fosfato quinase catalisa a fosforilação da ribulose-5-fosfato com ATP, regenerando, assim, o aceptor inicial de CO_2, ribulose-1,5-bifosfato (reação 12).

O ciclo de Calvin regenera seus próprios componentes bioquímicos

As reações do ciclo de Calvin regeneram os intermediários bioquímicos necessários para manter o ciclo em operação. Entretanto, mais importante é a possibilidade de aumento na velocidade de operação do ciclo de Calvin, em função de aumento na concentração de seus componentes intermediários; isto é, o ciclo é **autocatalítico**. Como conseqüência, o ciclo de Calvin possui a característica metabólica desejável de produzir mais substrato do que é consumido, desde que a triose fosfato não esteja sendo desviada para outra rota:

$$5\ RuBP^{4-} + 5\ CO_2 + 9\ H_2O + 16\ ATP^{4-} + 10\ NADPH \rightarrow$$
$$6\ RuBP^{4-} + 14\ P_i + 6\ H^+ + 16\ ADP^{3-} + 10\ NADP^+$$

A importância desta propriedade autocatalítica é demonstrada por experimentos onde folhas previamente mantidas no escuro ou cloroplastos isolados são iluminados. Nestes experimentos, a fixação do CO_2 inicia somente após um lapso (*lag*) de tempo, chamado de *período de indução*, e a taxa de fotossíntese aumenta com o passar do tempo nos primeiros minutos, logo após o início da iluminação. O aumento na taxa de fotossíntese durante o período de indução é devido em parte à ativação das enzimas pela luz (discutido mais tarde) e em parte a um aumento na concentração dos intermediários do ciclo de Calvin.

A estequiometria do ciclo de Calvin mostra que apenas um sexto da triose fosfato é utilizada na formação de sacarose ou amido

A síntese de carboidratos (amido, sacarose) gera um dreno forte o suficiente para a manutenção de um fluxo adequado de átomos de carbono através do ciclo de Calvin, sob condições de absorção contínua de CO_2. Uma característica importante deste ciclo é sua estequiometria geral. No início do período de iluminação, a maior parte das trioses fosfato são mantidas dentro do ciclo, para facilitar o acúmulo de uma concentração adequada de metabólitos. Entretanto, quando a fotossíntese atinge o ponto de equilíbrio, cinco sextos das trioses fosfato contribuem para a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato e um sexto é exportado ao citosol para a síntese de sacarose ou outros metabólitos que são convertidos a amido no cloroplasto.*

É necessário um *input* de energia, fornecida pelo ATP e NADPH, a fim de manter o ciclo em funcionamento, fixando CO_2. O cálculo realizado ao final da Tabela 8.1 mostra que, para sintetizar o equivalente a 1 molécula de hexose, 6 moléculas de CO_2 são fixadas ao custo de 18 ATP e 12 NADPH. Em outras palavras, o ciclo de Calvin consome duas moléculas de NADPH e três de ATP para cada uma de CO_2 fixado em carboidratos.

É possível calcular a eficiência termodinâmica máxima geral da fotossíntese se for conhecido o conteúdo de energia da luz, o requerimento quântico mínimo (moles de quanta absorvidos para cada mole de CO_2 fixado; ver Capítulo 7) e a energia estocada em cada molécula de carboidrato (hexose).

A luz vermelha a 680 nm contém 175 kJ (42 kcal) por mole de fótons. O requerimento quântico mínimo é geralmente calculado em 8 fótons por molécula de CO_2 fixada, embora o número obtido experimentalmente seja 9 a 10 (ver Capítulo 7). Desta forma, a quantidade mínima de energia luminosa necessária para reduzir 6 moles de CO_2 a um mole de hexose é aproximadamente $6 \times 8 \times 175$ kJ = 8.400 kJ (2.016 kcal). Entretanto, um mole de uma hexose tipo frutose libera apenas 2.804 kJ (673 kcal), quando totalmente oxidado.

Comparando 8.400 e 2.804 kJ, vê-se que a eficiência termodinâmica máxima geral da fotossíntese é de aproximadamente 33%. Entretanto, a maior parte da energia luminosa não-utilizada é perdida durante a geração do ATP e do NADPH pelas reações luminosas (ver Capítulo 7), em vez de durante a operação do ciclo de Calvin.

A eficiência do ciclo de Calvin pode ser mais diretamente calculada, computando-se as mudanças na energia livre associadas com a hidrólise do ATP e a oxidação do NADPH, que são 29 e 217 kJ (7 e 52 kcal) por mole, respectivamente. A lista que sumariza as reações do ciclo de Calvin mostrou que a síntese de 1 molécula de frutose-6-fosfato a partir de 6 moléculas de CO_2 utiliza 12 moléculas de NADPH e 18 de ATP. Assim, o ciclo de Calvin consome $(12 \times 217) + (18 \times 29) = 3126$ kJ (750 kcal) na forma de NADPH e ATP, resultando em uma eficiência termodinâmica de aproximadamente 90%.

Um exame desses cálculos mostra que a maior parte da energia necessária para a conversão do CO_2 a carboidrato vem do NADPH. Isto é, 2 moles de NADPH × 52 kcal mol^{-1} = 104 kcal, porém 3 moles de ATP × 7 kcal mol^{-1} = 21 kcal. Assim, 83% (104 de 125 kcal) da energia estocada provém do redutor NADPH.

O ciclo de Calvin não ocorre em todas as células autotróficas. Algumas bactérias anaeróbicas utilizam outras rotas para o crescimento autotrófico:

- A síntese, mediada pela ferrodoxina, de ácidos orgânicos derivados do acetil- e sucinil-CoA via uma reversão do ciclo do ácido cítrico (o ciclo redutivo do ácido carboxílico das bactérias verdes sulfurosas).
- O ciclo produtor de glioxilato (a rota do hidroxipropionato das bactérias verdes não-sulfurosas)
- A rota linear (rota do acetil-CoA) das bactérias acetogênicas e metanogênicas.

Embora o ciclo de Calvin seja quantitativamente a rota mais importante da fixação autotrófica do CO_2, outras rotas foram também descritas.

REGULAÇÃO DO CICLO DE CALVIN

A alta eficiência energética do ciclo de Calvin indica que alguma forma de regulação garante que todos os intermediários estejam em concentrações adequadas e que o ciclo seja desligado quando não se faz necessário durante o período de escuro. Em geral, variações na concentração ou na atividade específica de enzimas modulam as taxas catalíticas, ajustando, assim, o nível de metabólitos no ciclo.

Alterações na expressão gênica e na biossíntese de proteínas regulam a concentração de enzimas. Modificações pós-translacionais de proteínas contribuem para a regulação da atividade enzimática. Em âmbito genético, a quantidade de cada enzima presente no estroma do cloroplasto é regulada por mecanismos que controlam a expressão dos genomas do núcleo e do cloroplasto (Maier e cols., 1995; Purton, 1995).

No curto prazo, a regulação do ciclo de Calvin é obtida por vários mecanismos que otimizam a concentração dos intermediários. Tais mecanismos minimizam reações que operam em direções opostas, as quais desperdiçariam recursos (Wolosiuk e cols., 1993). Dois mecanismos gerais podem alterar as propriedades cinéticas das enzimas:

1. A transformação das ligações covalentes, tipo a redução dos dissulfitos e a carbamilação dos grupos amino, que vão gerar uma enzima quimicamente modificada.
2. A modificação das interações não-covalentes, tipo a ligação de metabólitos ou mudanças na composição do ambiente celular (p. ex., pH). Ademais, a ligação das enzimas às membranas do tilacóide aumenta a eficiência do ciclo de Calvin, alcançando, assim, um nível maior de organização que favorece a canalização e a proteção dos substratos.

A ativação de enzimas, dependente da luz, regula o ciclo de Calvin

Cinco enzimas reguladas pela luz operam no ciclo de Calvin:

1. Rubisco

*N. de T. É importante destacar que nem todas as trioses fosfato deixam o cloroplasto. Aquele um sexto das trioses fosfato não envolvidas com a regeneração da ribulose-1,5-bifosfato pode ser exportado para o citosol para a formação da sacarose ou permanecer no estroma do cloroplasto, onde será convertido a amido por intermédio de outros metabólitos.

2. NADP:gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
3. Frutose-1,6-bifosfatase
4. Sedo-heptulose-1,7-bifosfatase
5. Ribulose-5-fosfato quinase

As últimas quatro enzimas contêm um ou mais grupos dissulfito (—S—S—). A luz controla a atividade dessas quatro enzimas por intermédio do **sistema ferredoxina-tiorredoxina**, um mecanismo de oxirredução covalente baseado em um tiol e identificado por Bob Buchanan e colaboradores (Buchanan, 1980; Wolosiuk e cols., 1993; Besse e Buchanan, 1997; Schürmann e Jacquot, 2000). No escuro, esses resíduos estão no estado oxidado (—S—S—), que deixa a enzima inativa ou subativa. À luz, o grupo —S—S— é reduzido ao seu estado sulfidril (—SH HS—). Tal alteração redox leva à ativação da enzima (Figura 8.5). A resolução da estrutura cristalina de cada membro do sistema ferredoxina-tiorredoxina e das enzimas-alvo frutose-1,6-bifosfatase e NADP:malato desidrogenase (Daí e cols., 2000) forneceu valiosas informações sobre os mecanismos envolvidos nesses processos.

Esse sinal da sulfidrila (também chamada de ditiol) da proteína de regulação tiorredoxina é transmitido para enzimas-alvo específicas, resultando em sua ativação (ver **Tópico 8.4 na Internet**). Em alguns casos (tal como a frutose-1,6-bifosfatase), a ativação ligada à tiorredoxina é acentuada por um efetor (p. ex., o substrato frutose-1,6-bifosfato).

A inativação das enzimas-alvo, observada durante o escurecimento, parece ocorrer por uma reversão da rota de redução (ativação). Isto é, o oxigênio converte a tiorredoxina e as enzimas-alvo do estado reduzido (—SH HS—) para o estado oxidado (—S—S—), levando, assim, à inativação da enzima (ver Figura 8.5; ver também **Tópico 8.4 na Internet**). As últimas quatro enzimas listadas aqui são reguladas diretamente pela tiorredoxina; a primeira enzima, rubisco, é regulada indiretamente por uma enzima acessória da tiorredoxinaa rubisco ativase (ver a próxima seção).

FIGURA 8.5 O sistema ferredoxina-tiorredoxina reduz enzimas específicas na luz. A partir da redução, as enzimas biossintéticas são convertidas do estado inativo para um estado ativo. O processo de ativação inicia na luz pela redução da ferredoxina pelo fotossistema I (ver Capítulo 7). A ferredoxina reduzida mais dois prótons são utilizados para reduzir o grupo catalítico ativo dissulfito (—S—S—) da enzima ferro-sulfurosa ferredoxina:tiorredoxina redutase, o que, por sua vez, reduz a ligação dissulfito (—S—S—) altamente específica da pequena proteína regulatória tiorredoxina (ver **Tópico 8.4 na Internet**, para mais detalhes). A forma reduzida (—SH HS—) da tiorredoxina reduz, então, a ligação dissulfito crítica (converte —S—S— a —SH HS—) de uma enzima-alvo, levando, desse modo, à ativação daquela enzima. O sinal de luz é, assim, convertido a um sinal sulfidril, ou —SH, via ferredoxina e a enzima ferredoxina:tiorredoxina redutase.

A atividade da rubisco aumenta na luz

A atividade da rubisco também é regulada pela luz, porém a enzima não responde à tiorredoxina. George Lorimer e colaboradores descobriram que a rubisco é ativada quando um CO_2 de ativação (uma molécula diferente do CO_2 substrato que se torna fixado) reage lentamente com um grupo ε-NH_2 sem carga da lisina, dentro do sítio ativo da enzima. O derivado de carbamato resultante (um novo sítio aniônico) se liga, então, rapidamente ao Mg^{2+}, produzindo o complexo ativado (Figura 8.6).

Dois prótons são liberados durante a formação do complexo ternário rubisco-CO_2-Mg^{2+}, de forma que a ativação é promovida por um aumento no pH e na concentração de Mg^{2+}. Assim, as alterações em pH e Mg^{2+} dependentes da luz observadas no estroma (ver próxima seção) parecem facilitar a ativação observada da rubisco pela luz.

No estado ativo, a rubisco liga uma outra molécula de CO_2, que reage com a forma 2,3-enediol da ribulose-1,5-bifosfato (P-O-CH_2-COH=COH-CHOH-CH_2O-P), produzindo 2-carcoxil-3-cetoribitol 1,5-bifosfato. A extrema instabilidade deste último intermediário conduz à clivagem da ligação que une os carbonos 2 e 3 da ribulose-1,5-bifosfato e, como conseqüência, a rubisco libera duas moléculas de 3-fosfoglicerato.

A ligação de açúcares fosfato, tais como ribulose-1,5-bifosfato, à rubisco evita a carbamilação. Os açúcares fosfato podem ser removidos pela enzima rubisco ativase, em uma reação que requer o uso de ATP. A função principal da rubisco ativase é acelerar a liberação dos açúcares fosfato ligados, preparando, assim, a rubisco para a carbamilação (Salvucci e Ogren, 1996, ver também **Tópico 8.5 na Internet**).

A rubisco é também regulada por um açúcar fosfato natural, carboxiarabinitol-1-fosfato, muito semelhante ao intermediário transitório de seis carbonos da reação de carboxilação. Esse inibidor está presente em baixas concentrações nas folhas de muitas espécies e em altas concentrações nas folhas de leguminosas como a soja e o feijoeiro. Carboxiarabinitol-1-fosfato liga-se à rubisco à noite e é removido pela ação da rubisco ativase pela manhã, quando o fluxo de fótons aumenta.

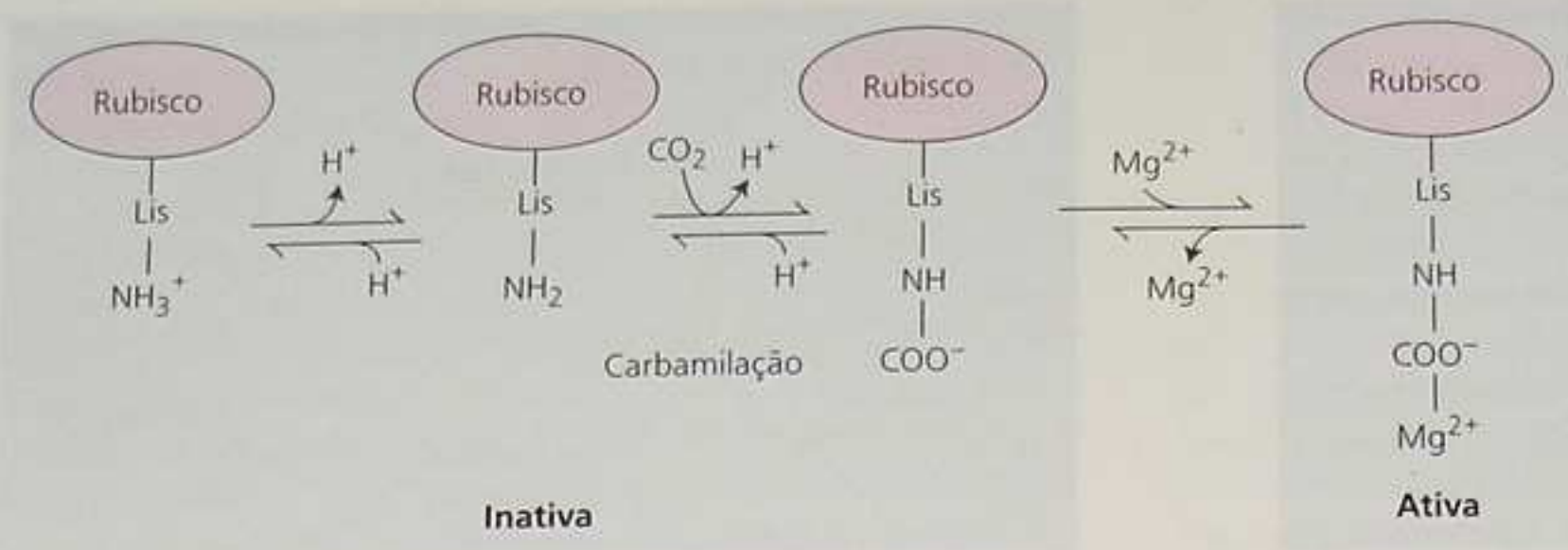



FIGURA 8.6 Uma maneira pela qual a rubisco é ativada envolve a formação de um complexo carbamato-Mg^{2+} no grupo ε-amino de uma lisina, dentro do sítio ativo da enzima. Dois prótons são liberados. A ativação é acentuada pelo aumento na concentração de Mg^{2+} e pH mais elevado (baixa concentração de H^+) que resulta da iluminação. O CO_2 participante da reação carbamato-Mg^{2+} não é o mesmo que o CO_2 envolvido na carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato.

Trabalhos recentes têm demonstrado que, em algumas plantas, a rubisco ativase é regulada pelo sistema ferredoxina-tiorredoxina (Zhang e Portis, 1999). Além de conectar a tiorredoxina a todas as cinco enzimas regulatórias do ciclo de Calvin, a descoberta fornece um novo mecanismo para ligar a luz à regulação da atividade enzimática.

Movimentos iônicos dependentes da luz regulam as enzimas do ciclo de Calvin

A luz provoca alterações iônicas reversíveis no estroma, as quais vão influenciar a atividade da rubisco e outras enzimas do cloroplasto. No momento em que a iluminação inicia, prótons são bombeados do estroma para o lume dos tilacóides. O efluxo de prótons é acoplado à absorção do Mg^{2+} para o estroma. Tais fluxos iônicos reduzem a concentração estromal de H^+ (pH 7 → 8) e aumentam a concentração de Mg^{2+}. Essas alterações na composição iônica do estroma do cloroplasto são invertidas quando escurece.

Várias enzimas do ciclo de Calvin (rubisco, frutose-1,6-bifosfatase, sedo-heptulose-1,7-bifosfatase e ribulose-5-fosfato quinase) são mais ativas em pH 8 do que em pH 7 e necessitam de Mg^{2+} como um co-fator para a catálise. Portanto, esses fluxos iônicos dependentes da luz aumentam a atividade de enzimas-chave do ciclo de Calvin (Heldt, 1979).

O transporte de membrana dependente da luz regula o ciclo de Calvin

A taxa na qual o carbono é exportado do cloroplasto tem função na regulação do ciclo de Calvin. O carbono é exportado como trioses fosfato em troca de ortofosfato por meio de um translocador de fosfato na membrana interna do envoltório do cloroplasto (Flügge e Heldt, 1991). Para garantir a operação contínua do ciclo de Calvin, pelo menos cinco sextos da triose fosfato precisam ser reciclados (ver Tabela 8.1 e Figura 8.3). Assim, no máximo um sexto pode ser exportado para a síntese de sacarose no citosol ou desviado para a síntese de amido dentro do cloroplasto. A regulação desse aspecto do metabolismo fotossintético do carbono será discutida mais adiante neste capítulo, quando se considerar a síntese de sacarose e amido.

O CICLO FOTOSSINTÉTICO OXIDATIVO C_2 DO CARBONO

Uma importante propriedade da rubisco é sua capacidade de catalisar tanto a reação de carboxilação quanto de oxigenação da RuBP. A oxigenação é a reação primária em um processo conhecido como **fotorrespiração**. Devido ao fato de a fotossíntese e a fotorrespiração trabalharem em direções diametralmente opostas, a fotorrespiração resulta em perda de CO_2 de células que estejam simultaneamente fixando CO_2 por meio do ciclo de Calvin (Ogren, 1984; Leegood e cols., 1995).

Nesta seção, será descrito o ciclo fotossintético oxidativo C_2 do carbono — as reações que resultam na recuperação parcial de carbono perdido pela oxidação.

A fixação fotossintética do CO_2 e a oxigenação fotorrespiratória são reações que competem entre si

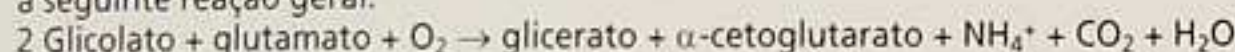
A incorporação de uma molécula de O_2 no isômero 2,3-enediol da ribulose-1,5-bifosfato gera um intermediário instável que é rapidamente quebrado em 2-fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato (Figura 8.7 e Tabela 8.2, reação 1). A capacidade de catalisar a oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato é uma propriedade de todas as rubiscos, independente da origem taxonômica. Mesmo a rubisco das bactérias autotróficas anaeróbicas catalisa a reação de oxigenase, quando exposta ao oxigênio.

Como substratos alternativos para a rubisco, CO_2 e O_2 competem pela reação com a ribulose-1,5-bifosfato, pois a carboxilação e oxigenação ocorrem dentro do mesmo sítio ativo da enzima. Oferecendo-se iguais quantidades de CO_2 e O_2 em um tubo de ensaio, as rubiscos de angiospermas fixam CO_2 aproximadamente 80 vezes mais rápido do que oxigenam. Entretanto, uma solução aquosa em equilíbrio com o ar, a 25 °C, possui uma razão CO_2:O_2 de

FIGURA 8.7 As principais reações do ciclo fotorrespiratório. O funcionamento do ciclo oxidativo fotossintético C_2 envolve a interação cooperativa de três organelas: cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Duas moléculas de glicolato (quatro carbonos), transportadas do cloroplasto para o peroxissomo, são convertidas à glicina que, por sua vez, é exportada para a mitocôndria e transformada em serina (três carbonos), com a liberação concomitante de um dióxido de carbono (um carbono). A serina é transportada para o peroxissomo e transformada em glicerato. Este último flui para o cloropasto, onde é fosforilado a 3-fosfoglicerato e incorporado ao ciclo de Calvin. O nitrogênio inorgânico (amônia) liberado pela mitocôndria é capturado pelo cloroplasto para incorporação em aminoácidos, utilizando os esqueletos de carbono apropriados (α-cetoglutarato). A grande seta vermelha marca a assimilação de amônia no glutamato, catalisada pela glutamina sintetase. Além disso, a captura do oxigênio no peroxissomo dá suporte a um curto ciclo do oxigênio acoplado às reações oxidativas. Os fluxos de carbono, nitrogênio e oxigênio estão indicados em preto, vermelho e azul, respectivamente. Ver Tabela 8.2, para a descrição de cada uma das reações numeradas.

TABELA 8.2
Reações do ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono

Enzima	Reação
1. Ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (cloroplasto)	2 Ribulose-1,5-bifosfato + 2 O_2 → 2 fosfoglicolato + 2 3-fosfoglicerato + 4 H^+
2. Fosfoglicolato fosfatase (cloroplasto)	2 fosfoglicolato + 2 H_2O → 2 glicolato + 2 P_i
3. Glicolato oxidase (peroxissomo)	2 glicolato + 2 O_2 → 2 glioxilato + 2 H_2O_2
4. Catalase (peroxissomo)	2 H_2O_2 → 2 H_2O + O_2
5. Glioxilato:glutamato aminotransferase (peroxissomo)	2 glioxilato + 2 glutamato → 2 glicina + 2 α-cetoglutarato
6. Glicina descarboxilase (mitocôndria)	glicina + NAD^+ + H^+ + H_4-ácido fólico → NADH + CO_2 + NH_4^+ + metileno-H_4-ácido fólico
7. Serina hidroximetiltransferase (mitocôndria)	Meitileno-H_4-ácido fólico + H_2O + glicina → serina + H_4-ácido fólico
8. Serina aminotransferase (peroxissomo)	serina + α-cetoglutarato → hidroxipiruvato + glutamato
9. Hidroxipiruvato redutase (peroxissomo)	Hidroxipiruvato + NADH + H^+ → glicerato + NAD^+
10. Glicerato quinase (cloroplasto)	Glicerato + ATP → 3-fosfoglicerato + ADP + H^+

Observações: Quando da liberação de glicolato do cloroplasto (reações 2 → 3), a interação dessa organela com o peroxissomo e o mitocôndria desencadeia a seguinte reação geral:
2 Glicolato + glutamato + O_2 → glicerato + α-cetoglutarato + NH_4^+ + CO_2 + H_2O
O 3-fosfoglicerato formado no cloroplasto (reação 10) é convertido a ribulose-1,5-bifosfato por meio das reações redutiva e regenerativa do ciclo de Calvin. A amônia e o α-cetoglutarato são convertidos a glutamato no cloroplasto pela ação da glutamato sintase (GOGAT) ligada à ferredoxina.
P_i significa fosfato inorgânico.

0,0416 (ver **Tópicos 8.2 e 8.3 da Intenet**). Nessas concentrações, a carboxilação no ar ganha da oxigenação por uma margem de apenas três para um.

O ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono atua como uma operação de rescaldo para recuperar o carbono fixado perdido durante a fotorrespiração pela reação oxigenase da rubisco (**Tópico 8.6 na Internet**). O 2-fosfoglicolato formado no cloroplasto pela oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato é rapidamente hidrolisado a glicolato por uma fosfatase específica do cloroplasto (Figura 8.7 e Tabela 8.2, reação 2). O metabolismo subseqüente do glicolato envolve a cooperação de outras duas organelas: peroxissomos e mitocôndrias (ver Capítulo 1) (Tolbert, 1981).

O glicolato deixa o cloroplasto por meio de uma proteína transportadora específica na membrana do envoltório e se difunde para o peroxissomo. Lá, é oxidado a glioxilato e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por uma oxidase dependente de uma flavina mononucleotídeo: glicolato oxidase (Figura 8.7 e Tabela 8.2, reação 3). As grandes quantidades de peróxido de hidrogênio liberadas no peroxissomo são destruídas pela ação da catalase (Tabela 8.2, reação 4), enquanto o glioxilato passa por uma transaminação (reação 5). O doador do grupo amino para esta transaminação é provavelmente o glutamato e o produto, o aminoácido glicina.

A glicina deixa o peroxissomo e entra na mitocôndria (ver Figura 8.7)). Lá, o complexo multienzimático glicina descarboxilase catalisa a conversão de duas moléculas de glicina e uma de NAD^+ a uma molécula de serina, NADH, NH_4^+ e CO_2 (Tabela 8.2, reações 6 e 7). O complexo multienzimático, presente em grandes concentrações na matriz das mitocôndrias das plantas, é composto por quatro proteínas, denominadas proteína-H (um polipeptídeo contendo uma lipoamida), proteína-P (uma proteína de 200 kDa, homodímero, contendo um piridoxal fosfato), proteína-T (uma proteína dependente do ácido fólico) e proteína-L (uma proteína contendo uma flavina adenina nucleotídeo).

A amônia formada durante a oxidação da glicina difunde-se rapidamente da matriz da mitocôndria para o cloroplasto, onde a glutamina sintetase irá combiná-la com os esqueletos de carbono para formar aminoácidos. A serina recém-formada deixa a mitocôndria e entra no peroxissomo, onde é convertida, primeiro por transaminação, a hidroxipiruvato e, depois, por uma redução dependente de NAD, a glicerato (reação 9).

Um *shuttle* de malato-oxalacetato transfere NADH do citoplasma para o peroxissomo, mantendo, assim, uma concentração adequada de NADH para esta reação. Finalmente, o glicerato reentra no cloroplasto, onde é fosforilado, produzindo 3-fosfoglicerato (Tabela 8.2, reação 10).

Na fotorrespiração, vários compostos circulam combinados por dois ciclos. Em um dos ciclos, o carbono sai do cloroplasto em duas moléculas de glicolato e retorna em uma molécula de glicerato. No outro ciclo, o nitrogênio deixa o cloroplasto em uma molécula de glutamato e retorna em uma molécula de amônia (juntamente com uma molécula de α-cetoglutarato) (ver Figura 8.7).

Em síntese, duas moléculas de fosfoglicolato (quatro átomos de carbono), perdidos do ciclo de Calvin pela oxigenação da RuBP, são convertidas em uma molécula de 3-fosfoglicerato (três átomos de carbono) e um CO_2. Em outras palavras, 75% do carbono perdido pela oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato são recuperados pelo ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono e retornados ao ciclo de Calvin (Lorimer, 1981).

Por outro lado, o nitrogênio inorgânico total permanece inalterado, pois a formação de nitrogênio inorgânico (NH_4^+) na mito-

côndria é balanceada pela síntese de glutamina no cloroplasto. Similarmente, o uso de NADH no peroxissomo (pela hidroxipiruvato redutase) é balanceado pela redução do NAD^+ na mitocôndria (pela glicina descarboxilase).

A competição entre a carboxilação e a oxigenação reduz a eficiência da fotossíntese

Devido à ocorrência simultânea da fotorrespiração e da fotossíntese, é muito difícil medir a taxa de fotorrespiração em células intactas. Duas moléculas de 2-fosfoglicolato (quatro átomos de carbono) são necessários para formar uma molécula de 3-fosfoglicerato, com a liberação de uma molécula de CO_2; assim, em teoria, um quarto do carbono que entra no ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono é liberado na forma de CO_2.

Medições de CO_2 liberado pelas folhas de girassol apóiam estes cálculos. Tal resultado indica que a taxa real de fotossíntese é aproximadamente 120 a 125% da taxa medida. A razão de carboxilação para oxigenação no ar, a 25 °C, é calculada entre 2,5 e 3. Cálculos mais precisos indicam que a fotorrespiração reduz a eficiência da fixação fotossintética do carbono de 90% para aproximadamente 50%.

Esta eficiência reduzida pode ser medida como um aumento na necessidade quântica para a fixação do CO_2 sob condições propícias para a fotorrespiração (ar com alto O_2 e baixo CO_2), opostas às condições não-fotorrespiratórias (baixo O_2 e alto CO_2).

A carboxilação e a oxigenação estão intimamente interligadas nas folhas intactas

O metabolismo fotossintético do carbono nas folhas intactas reflete o balanço integrado entre dois ciclos mutualmente opostos e interligados (Figura 8.8). O ciclo de Calvin pode operar independentemente, porém o ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono depende do ciclo de Calvin para o suprimento de ribulose-1,5-bifosfato. O balanço entre os dois ciclos é determinado por três fatores: as propriedades cinéticas da rubisco, as concentrações dos substratos CO_2 e O_2 e a temperatura.

Com o aumento da temperatura, a concentração de CO_2 em uma solução em equilíbrio com o ar decresce mais rapidamente do que a concentração de O_2 (ver **Tópico 8.3 na Internet**). Conseqüentemente, a razão das concentrações de CO_2 para O_2 decresce com o aumento da temperatura. Como resultado desta propriedade, a fotorrespiração (oxigenação) aumenta relativamente à fotossíntese (carboxilação) com o aumento da temperatura. Tal efeito é acentuado pelas propriedades cinéticas da rubisco, o que também resulta em um aumento relativo da oxigenação em altas temperaturas (Ku e Edwards, 1978). Em geral, então, o aumento progressivo da temperatura altera o balanço na direção oposta ao ciclo de Calvin e em direção do ciclo oxidativo fotossintético do carbono (ver Capítulo 9).

A função biológica da fotorrespiração é desconhecida

Embora o ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono recupere 75% do carbono originalmente perdido do ciclo de Calvin como 2-fosfoglicolato, por que há formação do 2-fosfoglicolato? Uma possível explicação é que a formação do 2-fosfoglicolato é uma conseqüência da química da reação de carboxilação, a qual requer um intermediário que possa reagir tanto com o CO_2 quanto com o O_2.

Tal reação teria pouca conseqüência durante os primórdios da evolução, se a razão de CO_2 para O_2 no ar fosse maior do que é hoje. Entretanto, as baixas razões CO_2:O_2 prevalecentes em tempos modernos conduzem à fotorrespiração, sem nenhuma outra função senão a recuperação de parte do carbono presente no 2-fosfoglicolato.

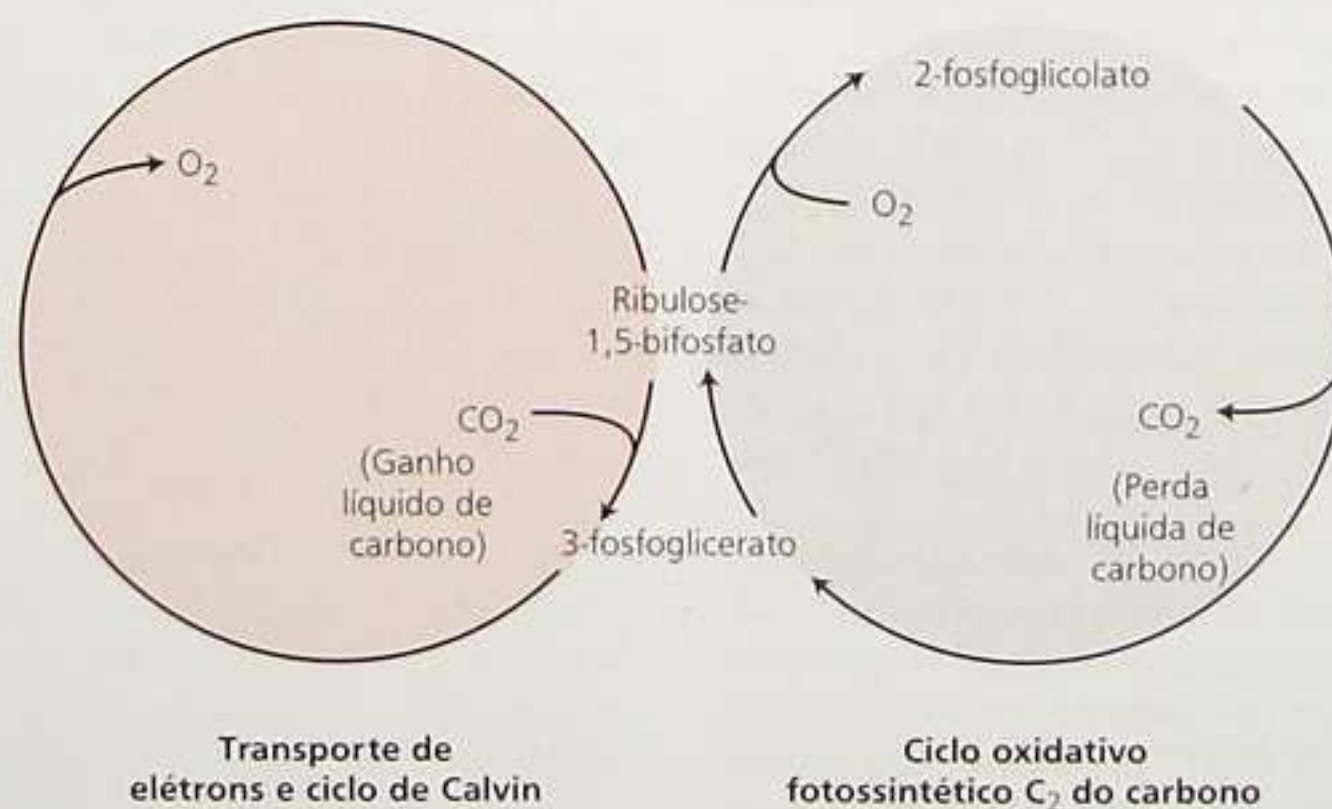



FIGURA 8.8 O fluxo de carbono na folha é determinado pelo balanço entre dois ciclos mutualmente opostos. Enquanto o ciclo de Calvin é capaz de operar independentemente na presença de substratos adequados gerados pelo transporte fotossintético de elétrons, o ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono requer uma operação continuada do ciclo de Calvin para regenerar seu material inicial, ribulose-1,5-bifosfato.

Outra possível explicação é que a fotorrespiração é importante, sobretudo sob condições de alta intensidade luminosa e baixa concentração intercelular de CO_2 (p. ex., no fechamento dos estômatos sob estresse hídrico), para dissipar o excesso de ATP e o poder redutor das reações luminosas e, assim, impedir possíveis danos ao aparelho fotossintético. Mutantes de *Arebidopsis* incapazes de fotorrespirar crescem normalmente sob concentrações de 2% de CO_2, porém morrem rapidamente se transferidos para o ar com concentrações normais. Existem evidências, de estudos com plantas transgênicas, que a fotorrespiração protege as plantas C_3 da fotoxidação e fotoinibição (Kozaki e Takeba, 1996). Mais estudos sobre a fotorrespiração são necessários para melhorar a compreensão a respeito do funcionamento desse processo.

MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO DO CO_2 I: BOMBAS DAS ALGAS E CIANOBACTÉRIAS

Muitas plantas não fotorrespiram ou fotorrespiram muito pouco. Essas plantas possuem rubiscos normais e sua falta de fotorrespiração é uma conseqüência de mecanismos que concentram o CO_2 no ambiente da rubisco, suprimindo, assim, a reação de oxigenação.

Nesta e nas duas seções seguintes, serão discutidos três mecanismos para concentrar CO_2 no sítio de carboxilação:

1. Fixação fotossintética do carbono via C_4 (C_4)
2. Metabolismo ácido das crassuláceas (CAM)
3. Bombas de CO_2 na membrana plasmática

Os dois primeiros mecanismos de concentração de CO_2 são encontrados em algumas angiospermas e envolvem adições ao ciclo de Calvin. Plantas com o metabolismo C_4 são em geral encontradas em ambientes quentes; plantas CAM são típicas de ambientes de deserto. Vamos examinar cada um desses dois sistemas, após considerar o terceiro mecanismo: uma bomba de CO_2 encontrada nas plantas aquáticas que tem sido extensivamente estudada em cianobactérias e algas unicelulares.

Quando cultivadas em ar enriquecido com 5% de CO_2 e depois transferidas para um meio com baixo CO_2, as células de algas e cianobactérias apresentam sintomas típicos de fotorrespiração (inibição da fotossíntese pelo O_2 em baixas concentrações de CO_2). Porém, se as células forem cultivadas em ar contendo 0,03% de CO_2, elas rapidamente desenvolvem a capacidade de concentrar internamente carbono inorgânico (CO_2 mais HCO_3^-). Sob tais condições de baixa concentração de CO_2, as células não apresentam mais a fotorrespiração.

A rubisco opera muito abaixo da sua atividade específica máxima nas concentrações de CO_2 encontradas em ambientes aquáticos. Organismos marinhos e de água doce superam tal problema acumulando carbono inorgânico, por meio de bombas de CO_2 e HCO_3^- na membrana plasmática. O ATP proveniente das reações luminosas fornece a energia necessária para a captação ativa do CO_2 e do HCO_3^-. O carbono inorgânico total dentro de algumas células de cianobactérias pode atingir concentrações de 50 m*M* (Ogawa e Kaplan, 1987). Trabalhos recentes indicam que um único gene que codifica um fator de transcrição pode regular a expressão dos genes que codificam os componentes do mecanismo de concentração do CO_2 nas algas (Xiang e cols., 2001).

As proteínas que funcionam como bombas de CO_2 e HCO_3^- não estão presentes em células que crescem em altas concentrações de CO_2, mas sua expressão é induzida quando as células são expostas a baixas concentrações de CO_2. O HCO_3^- acumulado é convertido a CO_2 pela enzima anidrase carbônica e o CO_2 entra no ciclo de Calvin.

A conseqüência metabólica deste enriquecimento em CO_2 é a supressão da oxigenação da ribulose bifosfato e, desta forma, a supressão da fotorrespiração. O custo energético de tal adaptação é o ATP adicional necessário para concentrar o CO_2.

MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO DO CO_2 II: O CICLO C_4 DO CARBONO

Existem diferenças na anatomia das folhas entre plantas que possuem o ciclo C_4 do carbono (chamadas de *plantas* C_4) e aquelas que fotossintetizam somente via o ciclo fotossintético de Calvin (*plantas* C_3). Uma secção transversal de uma folha típica C_3 revela um tipo principal de células que possuem cloroplastos, o **mesofilo**. Já uma folha típica C_4 possui dois tipos distintos de células que contêm cloroplastos: células do mesofilo e **bainha vascular** (ou *Kranz*, coroa em alemão) (Figura 8.9).

Há uma considerável variação anatômica no arranjo dessas células da bainha vascular com relação ao mesofilo e ao tecido vascular. Em todos os casos, entretanto, a operação do ciclo C_4 requer um esforço cooperativo de ambos os tipos de células*. Nenhuma célula do mesofilo de um planta C_4 está a mais do que duas ou três células de distância da célula de bainha mais próxima (ver Figura 8.9A). Além disso, uma extensiva rede de plasmodesmas (ver Figura 1.27) conecta as células do mesofilo e da bainha, fornecendo, assim, uma rota para o fluxo de metabólitos entre os dois tipos de células.

O malato e o aspartato são os produtos da carboxilação do ciclo C_4

A marcação inicial de ácidos C_4 foi observada primeiro em estudos com $^{14}CO_2$ em cana-de-açúcar, por H.P. Kortshack e colaboradores, e em milho, por Y. Karpilov e colaboradores. Quando as folhas eram expostas ao $^{14}CO_2$ por alguns segundos, na presença de luz, 70 a 80% do marcador eram recuperados nos ácidos C_4 malato e aspartato — um padrão muito diferente daquele observado nas folhas que fotossintetizam somente via ciclo de Calvin.

Na busca dessas observações iniciais, M.D. Hatch e C.R. Slack elucidaram o que é hoje conhecido como o ciclo fotossintético C_4 do carbono (ciclo C_4) (Figura 8.10). Eles descobriram que os ácidos C_4 malato e aspartato são os primeiros intermediários estáveis detectáveis da fotossíntese em folhas de cana-de-açúcar e que o átomo de carbono 4 do malato, subseqüentemente, torna-se o átomo de carbono 1 do 3-fosfoglicerato (Hatch e Slack, 1966). A carboxilação inicial nessas folhas não é catalisada pela rubisco, mas pela PEP (fosfoenolpiruvato) carboxilase (Chollet e cols., 1996).

*N. de T. Estudos recentes, com plantas da família Chenopodiaceae, demonstram que é possível a ocorrência de fotossíntese C_4 em plantas terrestres, sem que haja a separação dos processos em dois tipos de células. É a chamada fotossíntese C_4 em uma única célula. Para mais detalhes, ver "Sage R.F. 2002. C_4 photosynthesis in terrestrial plants does not require Kranz anatomy. *Trends in Plant Science* 7 (7): 283-285" e referências citadas neste trabalho.

(A)

(B)

(C)

(D)

(E)

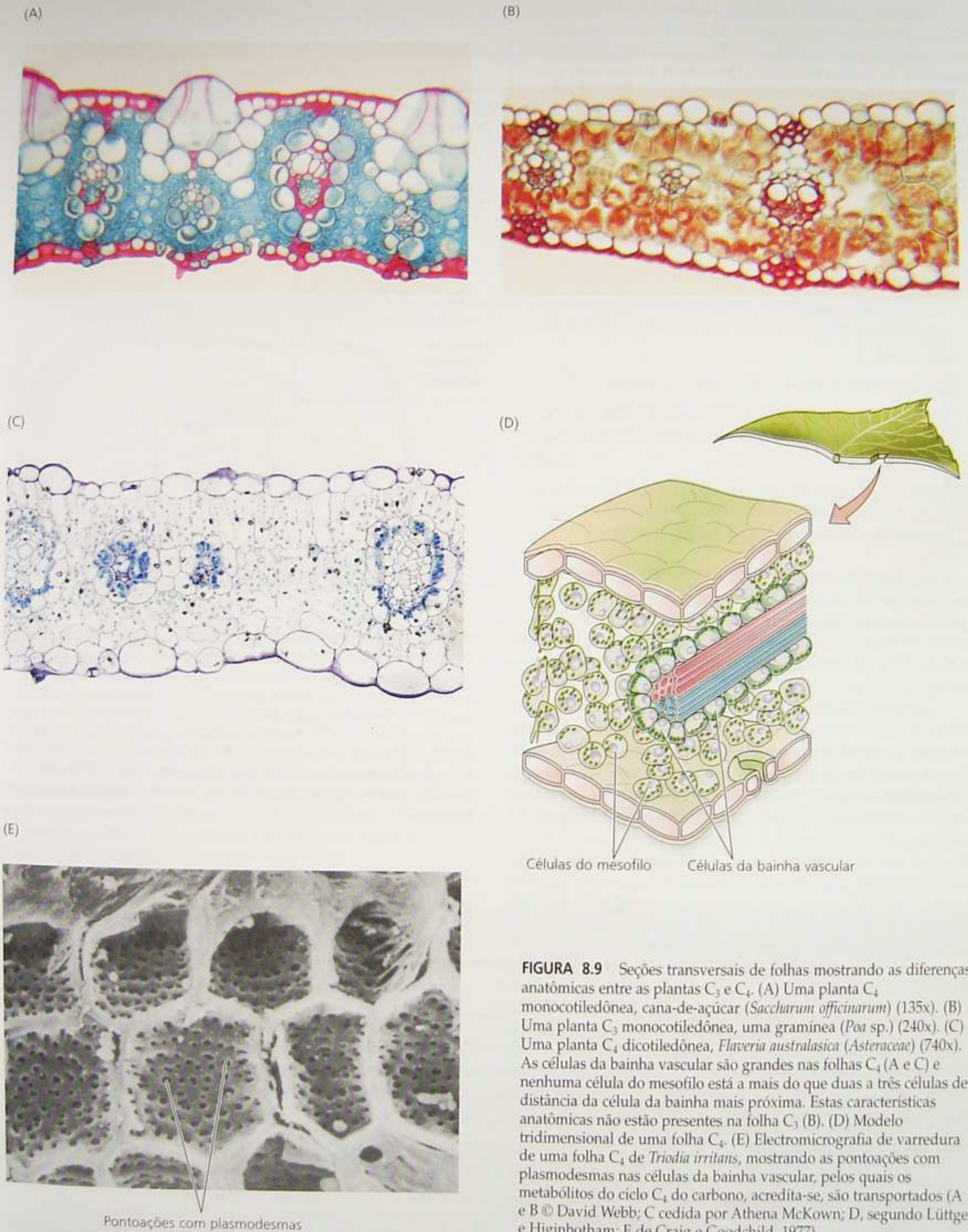



FIGURA 8.9 Seções transversais de folhas mostrando as diferenças anatômicas entre as plantas C_3 e C_4. (A) Uma planta C_4 monocotiledônea, cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (135x). (B) Uma planta C_3 monocotiledônea, uma gramínea (*Poa* sp.) (240x). (C) Uma planta C_4 dicotiledônea, *Flaveria australasica* (*Asteraceae*) (740x). As células da bainha vascular são grandes nas folhas C_4 (A e C) e nenhuma célula do mesofilo está a mais do que duas a três células de distância da célula da bainha mais próxima. Estas características anatômicas não estão presentes na folha C_3 (B). (D) Modelo tridimensional de uma folha C_4. (E) Electromicrografia de varredura de uma folha C_4 de *Triodia irritans*, mostrando as pontoações com plasmodesmas nas células da bainha vascular, pelos quais os metabólitos do ciclo C_4 do carbono, acredita-se, são transportados (A e B © David Webb; C cedida por Athena McKown; D, segundo Lüttge e Higinbotham; E de Craig e Goodchild, 1977).

A maneira pela qual o carbono é transferido do átomo de carbono 4 do malato para o átomo de carbono 1 do 3-fosfoglicerato tornou-se clara, quando o envolvimento das células do mesofilo e da bainha vascular foi elucidado. As enzimas que participam do processo ocorrem em um dos dois tipos de células — PEP carboxilase e a piruvato ortofosfato diquinase — são restritas às células do mesofilo; as descarboxilases e as enzimas do ciclo completo de Calvin estão confinadas às células da bainha vascular. Com esse conhecimento, Hatch e Slack puderam formular um modelo básico do ciclo (Figura 8.11 e Tabela 8.3).

O ciclo C_4 concentra CO_2 nas células da bainha vascular

O ciclo C_4 básico consiste de 4 estádios:

1. Fixação do CO_2 pela fosfoenolpiruvato carboxilase nas células do mesofilo, para formar um ácido C_4 (malato e/ou aspartato)
2. Transporte dos ácidos C_4 para a bainha vascular
3. Descarboxilação dos ácidos C_4 dentro da bainha vascular gerando CO_2, que é então reduzido a carboidrato via ciclo de Calvin
4. Transporte do ácido C_3 (piruvato ou alanina), formado na etapa de descarboxilação, de volta à célula do mesofilo e regeneração do aceptor de CO_2 fosoenolpiruvato.

Uma característica interessante do ciclo é que a regeneração do aceptor primário — fosfoenolpiruvato — consome duas ligações fosfato de "alta energia": uma na reação catalisada pela piruvato ortofosfato diquinase (Tabela 3, reação 8) e outra na conversão do PP_i a 2 P_i catalisada pela pirofosfatase (reação 9; ver também Figura 8.11).

O transporte de metabólitos entre as células do mesofilo e da bainha vascular é acionado por gradientes de difusão ao longo dos numerosos plasmodesmas; o transporte dentro das células é regulado por gradientes de concentração e pela operação de transportadores especializados no envoltório do cloroplasto. Assim, o ciclo transfere efetivamente CO_2 da atmosfera para as células da bainha

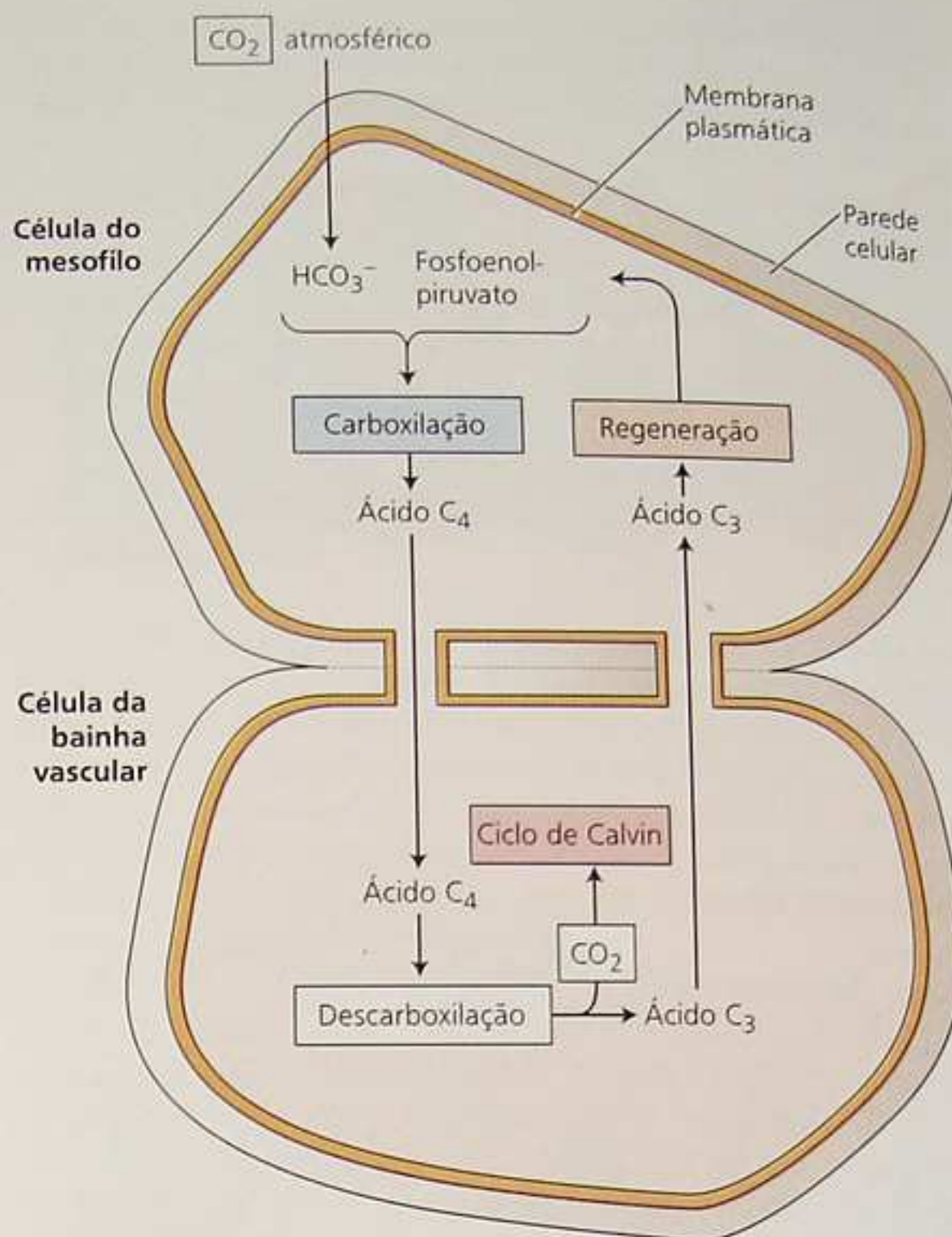



FIGURA 8.10 O ciclo fotossintético C_4 básico envolve quatro estádios em dois tipos diferentes de células: (1) Fixação do CO_2 em um ácido de quatro carbonos em uma célula do mesofilo (2) Transporte do ácido de quatro carbonos de uma célula do mesofilo para uma célula da bainha vascular (3) Descarboxilação do ácido de quatro carbonos gerando uma alta concentração de CO_2 na célula da bainha vascular. O CO_2 liberado é fixado pela rubisco e convertido a carboidrato pelo ciclo de Calvin. (4) Transporte do ácido de três carbonos residual de volta à célula do mesofilo, onde o aceptor original de CO_2, fosfoenolpiruvato, é regenerado.

TABELA 8.3
Reações do ciclo fotossintético C_4 do carbono

Enzima	Reação
1. Fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase	Fosfoenolpiruvato + HCO_3^- → oxalacetato + P_i
2. NADP:malato desidrogenase	Oxalacetato + NADPH + H^+ → malato + $NADP^+$
3. Aspartato aminotransferase	Oxalacetato + glutamato → aspartato + α-cetoglutarato
4. Enzima NAD(P) málica	Malato + $NAD(P)^+$ → piruvato + CO_2 + NAD(P)H + H^+
5. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Oxalacetato + ATP → fosfoenolpiruvato + CO_2 + ADP
6. Alanina aminotransferase	Piruvato + glutamato ↔ alanina + α-cetoglutarato
7. Adenilato quinase	AMP + ATP → 2 ADP
8. Piruvato-ortofosfato diquinase	Piruvato + P_i + ATP → fosfoenolpiruvato + AMP + PP_i
9. Pirofosfatase	PP_i + H_2O → 2 P_i

Nota: P_i e PP_i significam fosfato inorgânico e pirofosfato, respectivamente.

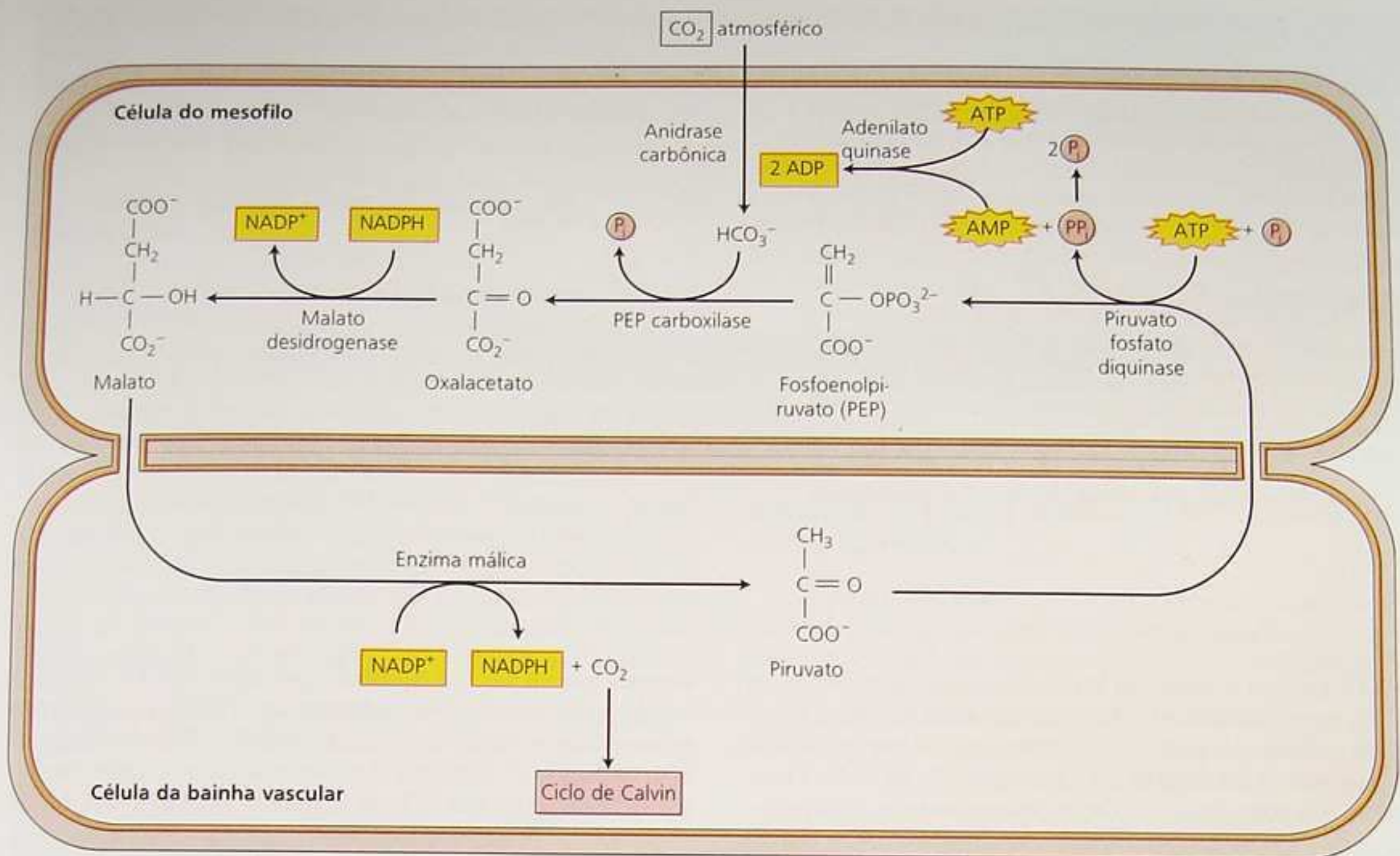



FIGURA 8.11 A rota fotossintética C_4. A hidrólise de dois ATPs força o ciclo na direção das setas, bombeando, assim, CO_2 da atmosfera para o ciclo de Calvin dos cloroplastos da bainha vascular.

vascular. Esse processo de transporte gera uma concentração de CO_2 nas células da bainha vascular muito mais elevada do que poderia ocorrer se houvesse equilíbrio com a atmosfera externa à folha. Esta concentração elevada de CO_2 nos sítios de carboxilação da rubisco resulta na supressão da oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato e, por conseqüência, da fotorrespiração.

Descoberto nas gramíneas tropicais cana-de-açúcar e milho, o ciclo C_4 ocorre sabidamente em 16 famílias tanto de monocotiledôneas quanto de dicotiledôneas e é particularmente proeminente em Poaceae (milho, milheto, sorgo, cana-de-açúcar), Chenopodiaceae (*Atriplex*) e Cyperaceae. Aproximadamente 1% de todas as espécies conhecidas possuem metabolismo C_4 (Edwards e Walker, 1983).

Existem três variações do ciclo básico C_4 que ocorrem em diferentes espécies (ver **Tópico 8.7 na Internet**). As variações diferem principalmente em relação ao ácido C_4 (malato ou aspartato) transportado para a bainha vascular e na maneira de descarboxilação.

A concentração do CO_2 nas células da bainha vascular tem um alto custo energético

O efeito líquido do ciclo C_4 é a conversão de uma solução diluída de CO_2 nas células do mesofilo em uma solução de CO_2 concentrada nas células da bainha vascular. Estudos com um mutante de *Amaranthus edulis*, deficiente em PEP carboxilase, mostram claramente que a falta de um mecanismo efetivo para concentrar o CO_2 na bainha vascular aumenta fortemente a fotorrespiração em uma planta C_4 (Dever e cols., 1996).

A termodinâmica diz-nos que é necessário trabalho para estabelecer e manter o gradiente de concentração de CO_2 na bainha vascular (para uma discussão detalhada da termodinâmica, ver **Capítulo 2 na Internet**). Este princípio também se aplica à operação do ciclo C_4. Do somatório das reações envolvidas, pode-se calcular o custo energético para a planta (Tabela 8.4). O cálculo mostra que o processo de concentração do CO_2 consome dois equivalentes de ATP (duas ligações de "alta energia") por molécula de CO_2 transportada. Assim, a exigência total de energia para a fixação de CO_2 pelos ciclos C_4 e de Calvin combinados (calculados nas Tabelas 8.4 e 8.1, respectivamente) é de cinco ATP mais dois NAPH por CO_2 fixado.*

Em decorrência desta maior demanda energética, as plantas C_4 fotossintetizando sob condições que inibam a fotorrespiração

*N. de T. Dependendo da enzima responsável pelo processo de descarboxilação do CO_2 nas células da bainha vascular (ver subtipos no **Tópico 8.7 na Internet**), o custo pode ficar em cinco ou **seis** moléculas de ATP, mais dois NADPH, por cada CO_2 fixado (ver D.W.Lawlor 1995 *Photosynthesis: Metabolism, Control and Physiology*. New York: John Wiley & Sons, pp. 182-201).

TABELA 8.4
Cálculo da energia do ciclo fotossintético C_4 do carbono

Fosfoenolpiruvato + H_2O + NADPH + CO_2 (mesofilo)	→ malato + $NADP^+$ + P_i (mesofilo)
Malato + $NADP^+$	→ piruvato + NADPH + CO_2 (bainha vascular)
Piruvato + P_i + ATP	→ fosfoenolpiruvato + AMP + PP_i (mesofilo)
PP_i + H_2O	→ 2 P_i (mesofilo)
AMP + ATP	→ 2 ADP
Líquido: CO_2 (mesofilo) + ATP + 2 H_2O	→ CO_2 (bainha vascular) + 2 ADP + 2 P_i

Custo para concentrar CO_2 dentro da célula da bainha vascular = 2 ATP por CO_2

Notas: Como mostrado na reação 1 da Tabela 8.3, o H_2O e o CO_2 exibidos na primeira linha desta tabela reagem com o fosfoenolpiruvato na forma de HCO_3^-.
P_i e PP_i significam fosfato inorgânico e pirofosfato, respectivamente.

(alto CO_2 e baixo O_2) requerem um maior número de *quanta* de luz por CO_2 do que as plantas C_3. Em uma atmosfera normal, o requerimento quântico das plantas C_3 é alterado por fatores que afetam o balanço entre a fotossíntese e a fotorrespiração, tal como a temperatura. Por outro lado, em função dos mecanismos construídos para evitar a fotorrespiração, o requerimento quântico das plantas C_4 permanece constante sob diferentes condições ambientais (ver Figura 9.23).

A luz regula a atividade de enzimas-chave de C_4

A luz é essencial para a operação do ciclo C_4 porque regula várias enzimas específicas. Por exemplo, as atividades da PEP carboxilase, NADP:malato desidrogenase e piruvato ortofosfato diquinase (ver Tabela 8.3) são reguladas em resposta a variações na densidade do fluxo de fótons por dois processos diferentes: redução-oxidação dos grupos tiol e fosforilação-desfosforilação.

A NADP:malato desidrogenase é regulada via sistema tiorredoxina do cloroplasto (ver Figura 8.5). A enzima é reduzida (ativada) com a iluminação das folhas e oxidada (inativada) quando escurece. A PEP carboxilase é ativada por um mecanismo de fosforilação-desfosforilação dependente da luz que ainda não foi caracterizado.

O terceiro membro regulador da rota C_4, piruvato ortofosfato diquinase, é rapidamente inativado por uma estranha fosforilação da enzima dependente de ADP, quando a densidade do fluxo de fótons decresce (Burnell e Hatch, 1985). A ativação é obtida pela clivagem fosfolítica desse grupo fosfato. Ambas as reações, fosforilação e desfosforilação, parecem ser catalisadas por uma única proteína regulatória.

O ciclo C_4 reduz a fotorrespiração e a perda de água em climas quentes e secos

Duas características do ciclo C_4 nas plantas C_4 suprimem os efeitos deletérios das altas temperaturas na fotossíntese anteriormente citados. Primeiro, a afinidade da PEP carboxilase por seu substrato, HCO_3^-, é suficientemente alta, o que mantém a enzima saturada por HCO_3^- em equilíbrio com níveis de CO_2 atmosféricos. Ademais, devido ao seu substrato ser o HCO_3^-, o oxigênio não é competidor na reação. Essa alta atividade da PEP carboxilase permite às plantas C_4 reduzir a abertura estomática e, assim, conservar água, enquanto fixa CO_2 em velocidade igual ou maior do que as plantas C_3. A segunda característica benéfica é a supressão da fotorrespiração, resultante da concentração do CO_2 nas células da bainha vascular (Marocco e cols., 1998).

Tais características permitem às plantas C_4 fotossintetizar mais eficientemente em altas temperaturas do que as plantas C_3 e elas são, provavelmente, a razão da relativa abundância de plantas C_4 em ambientes mais secos e quentes. Dependendo das condições em seus ambientes naturais, algumas plantas podem apresentar propriedades intermediárias entre espécies estreitamente C_3 e C_4.

MECANISMO DE CONCENTRAÇÃO DO CO_2 III: METABOLISMO ÁCIDO DAS CRASSULÁCEAS

Um terceiro mecanismo de concentração do CO_2 no sítio da rubisco é encontrado no metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Apesar do seu nome, as CAM não estão restritas à família Crassulaceae (*Crassula, Kalanchoe, Sedum*); tal mecanismo é encontrado em um grande número de famílias de angiospermas. Os cactos e as eufórbias são plantas CAM, bem como abacaxi, baunilha e agave.

O mecanismo CAM permite às plantas melhorarem a eficiência do uso da água. Tipicamente, uma planta CAM perde 50 a 100 g de água para cada grama de CO_2 obtido, comparado com valores de 250 a 300 g e 400 a 500 g para plantas C_4 e C_3, respectivamente (ver Capítulo 4). Assim, as plantas CAM possuem uma vantagem competitiva em ambientes secos.

O mecanismo CAM é similar em muitos aspectos ao ciclo C_4. Nas plantas C_4, a formação dos ácidos C_4 no mesofilo é espacialmente separada da descarboxilação dos ácidos C_4 e da refixação do CO_2 resultante pelo ciclo de Calvin na bainha vascular. Nas plantas CAM, a formação dos ácidos C_4 é tanto temporal como espacialmente separada. À noite, o CO_2 é capturado pela PEP carboxilase no citosol, e o malato formado a partir do oxalacetato é

estocado no vacúolo (Figura 8.12). Durante o dia, o malato estocado é transportado para o cloroplasto e descarboxilado pela enzima NADP-málica, o CO_2 liberado é fixado pelo ciclo de Calvin e o NADPH é utilizado para converter o produto triose fosfato descarboxilado em amido.

Os estômatos das CAM abrem à noite e fecham durante o dia

As plantas CAM, tais como os cactos, por exemplo, atingem sua alta eficiência de uso da água abrindo os seus estômatos durante as noites frias do deserto e fechando-os durante o período seco e quente do dia. O fechamento dos estômatos durante o dia minimiza a perda de água, mas, uma vez que a água e o CO_2 partilham a mesma rota de difusão, o CO_2 necessita ser capturado à noite.

O CO_2 é incorporado, via carboxilação do fosfoenolpiruvato, a oxalacetato, o qual é então reduzido a malato. O malato acumula-se e é estocado em grandes vacúolos, que constituem uma característica anatômica típica, mas não obrigatória, das células foliares das plantas CAM (ver Figura 8.12). O acúmulo de quantidades substanciais de ácido málico, equivalente à quantidade de CO_2 assimilado durante a noite, há tempo foi reconhecido como uma acidificação noturna da folha (Bonner e Bonner, 1948).

Com o início do período do dia, os estômatos fecham, evitando a perda de água e a conseqüente entrada do CO_2. Na medida em que as reservas de ácido málico são consumidas, as células das folhas perdem a acidez. A descarboxilação é geralmente realizada pela ação da enzima NADP-málica sobre malato (Drincovich e cols., 2001). Uma vez que os estômatos estão fechados, o CO_2 liberado internamente não pode escapar da folha e, em vez disto, é fixado e convertido a carboidrato pelo ciclo de Calvin.

A elevada concentração interna de CO_2 efetivamente suprime a oxigenação fotorrespiratória da ribulose bifosfato e favorece a carboxilação. Acredita-se que o ácido C_3 resultante da descarboxilação é convertido primeiro a triose fosfato e, depois, a amido ou sacarose, regenerando, assim, a fonte do aceptor original do carbono.

A fosforilação regula a atividade da PEP carboxilase nas plantas C_4 e CAM

O mecanismo CAM aqui descrito necessita da separação da carboxilação inicial da subseqüente descarboxilação, a fim de evitar um ciclo inútil. Além da separação espacial e temporal exibidas

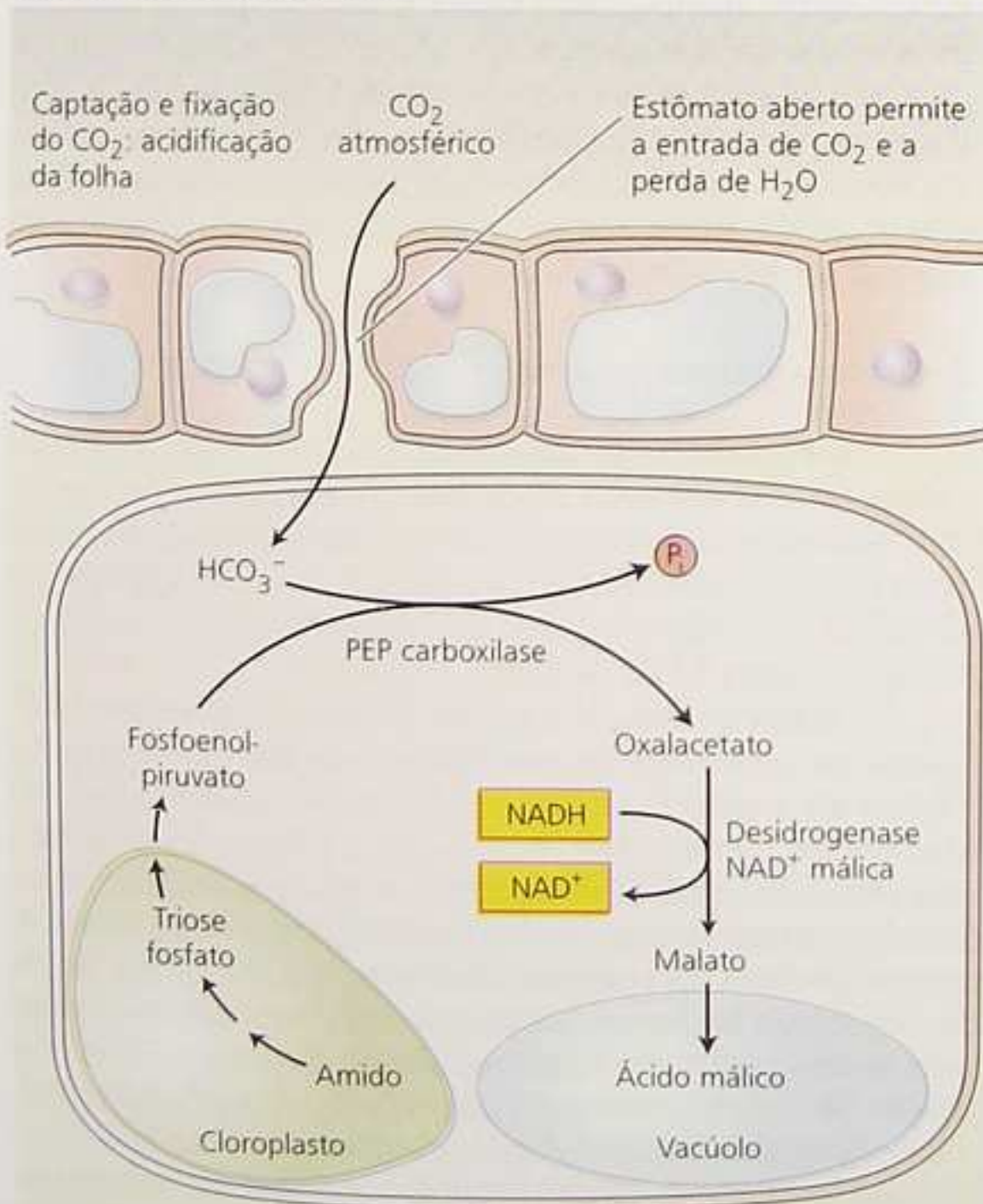
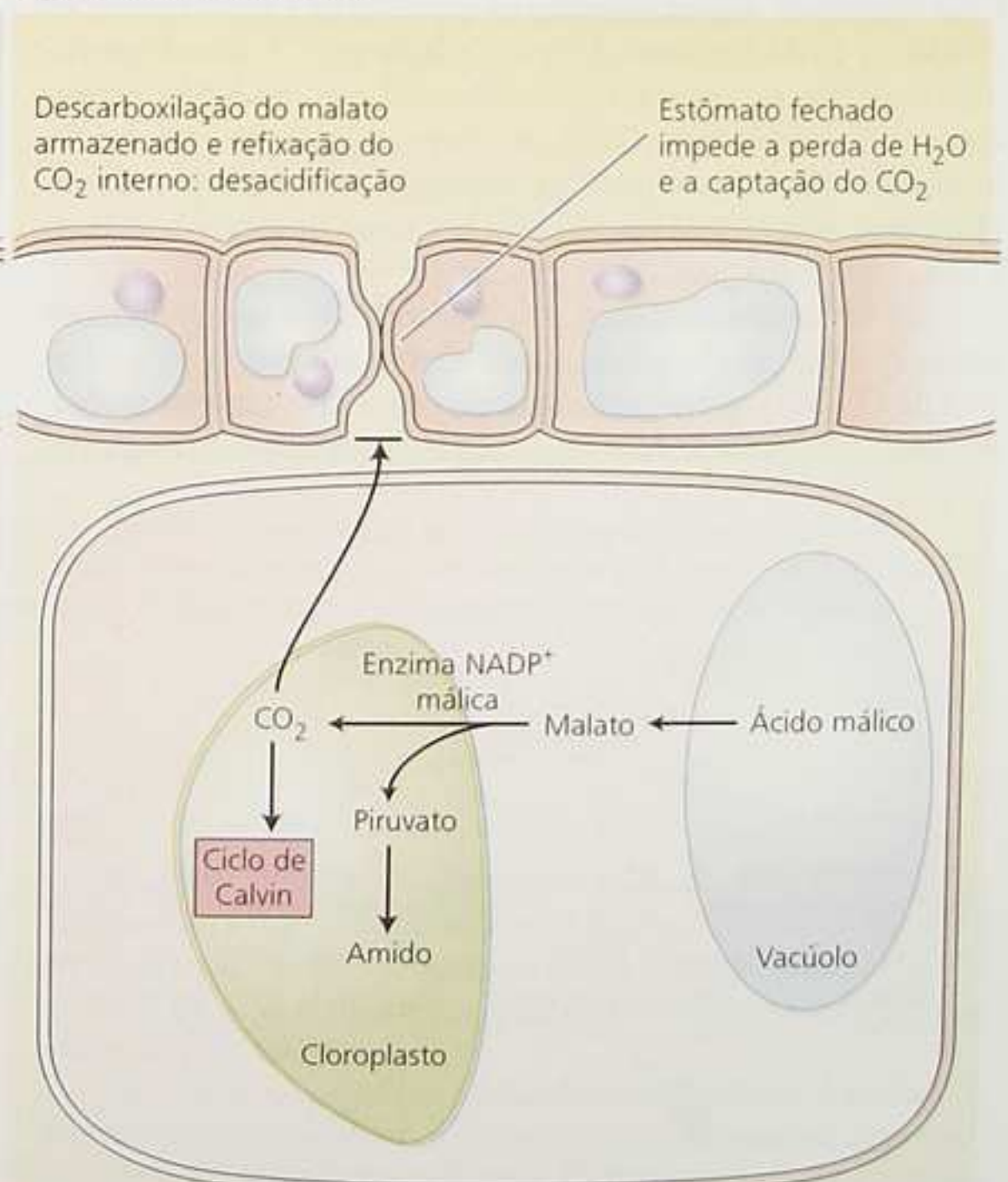



FIGURA 8.12 Metabolismo ácido das crassuláceas (CAM). Separação temporal da captação do CO_2 e das reações fotossintéticas: a captação e a fixação do CO_2 ocorrem à noite, enquanto a descarboxilação e refixação do CO_2 liberado internamente realizam-se durante o dia. A vantagem adaptativa das CAM é a redução da perda de água pela transpiração, conseguida pela abertura dos estômatos durante a noite.

pelas plantas C_4 e CAM, respectivamente, a inutilidade do ciclo é evitada pela regulação da PEP carboxilase (Figura 8.13). Nas plantas C_4 a carboxilase está "ligada", ou ativa, durante o dia, e nas plantas CAM, durante a noite. Tanto nas plantas C_4 quanto nas CAM, a PEP carboxilase é inibida por malato e ativada pela glicose-6-fosfato (ver **Ensaio 8.1 na Internet**, para uma discussão detalhada da regulação da PEP carboxilase).

A fosforilação de um único resíduo de serina da enzima da CAM reduz a inibição do malato e acentua a ação da glicose-6-fosfato, de forma que a enzima torna-se cataliticamente mais ativa (Chollet e cols., 1996; Vidal e Chollet, 1997) (ver Figura 8.13). A fosforilação é catalisada por uma PEP carboxilase-quinase. A síntese dessa quinase é estimulada pelo efluxo de Ca^{2+} do vacúolo para o citosol e a resultante ativação de uma quinase protéica Ca^{2+}/calmodulina (Giglioli-Guivarc'h e cols., 1996; Coursol e cols., 2000; Nimmo, 2000; Bakrim e cols., 2001).

Algumas plantas ajustam seu padrão de captação de CO_2 às condições ambientais

As plantas possuem muitos mecanismos que maximizam o suprimento de água e CO_2 durante o desenvolvimento e a reprodução. As plantas C_3 regulam a abertura estomática de suas folhas durante o dia e os estômatos fecham durante a noite. Plantas C_4 e CAM utilizam a PEP carboxilase para fixar CO_2 e elas separam esta enzima da rubisco espacial (plantas C_4) ou temporalmente (plantas CAM).

Algumas plantas CAM apresentam regulação de longo prazo e são capazes de ajustar o padrão de captação de CO_2 às condições climáticas. CAM facultativas, tipo a "planta gelo" (*Mesembryanthemum crystallinum*), realizam metabolismo C_3 sob condições de não-estresse e alteram para CAM em resposta ao estresse térmico, hídrico ou salino. Essa forma de regulação requer a expressão de numerosos genes CAM em resposta aos sinais de estresse (Adams e cols., 1998; Cushman, 2001).

Em ambientes aquáticos, as cianobactérias e as algas verdes possuem água em abundância, mas encontram baixas concentrações de CO_2 no entorno, necessitando concentrar carbono inorgânico intracelularmente. Nas diatomáceas, abundantes no fitoplâncton, há um mecanismo de concentração de CO_2 que opera simultaneamente com a rota C_4 (Reinfelder e cols., 2000). As diatomáceas constituem um ótimo exemplo de organismos fotossintetizantes que possuem a capacidade de empregar diferentes mecanismos de concentração de CO_2 em resposta a flutuações ambientais.

FIGURA 8.13 Regulação diária da fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase de planta CAM. A fosforilação de um resíduo de serina (Ser-OP) produz uma forma da enzima que é ativa durante a noite e relativamente insensível ao malato. Durante o dia, a desfosforilação da serina (Ser-OH) produz a forma da enzima que é inibida pelo malato.

SÍNTESE DE AMIDO E DE SACAROSE

Na maioria das espécies, a sacarose é a principal forma de carboidrato translocado através da planta pelo floema. O amido é uma reserva estável e insolúvel de carboidratos, presente em quase todas as plantas. Tanto o amido como a sacarose são sintetizados a partir da triose fosfato gerada pelo ciclo de Calvin (ver Tabela 8.1) (Beck e Ziegler, 1989). As rotas para a síntese de amido e de sacarose são mostradas na Figura 8.14.

O amido é sintetizado no cloroplasto

Electromicrografias mostrando pronunciados depósitos de amido e estudos de localização de enzimas não deixam dúvidas de que o sítio de síntese do amido nas folhas é o cloroplasto (Figura 8.15). O amido é sintetizado a partir da triose fosfato via frutose-1,6-bifosfato (Tabela 8.5 e Figura 8.14). A glicose-1-fosfato intermediária é convertida a ADP-glicose via uma ADP-glicose pirofosforilase (Figura 8.14 e Tabela 8.5, reação 5) em uma reação que requer ATP e produz pirofosfato (PP_i, ou $H_2P_2O_7^{2-}$).

Assim como em muitas reações biossintéticas, o pirofosfato é hidrolisado a duas moléculas de ortofosfato (P_i) por meio de uma pirofosfatase inorgânica específica (Tabela 8.5, reação 6), acionando, deste modo, a reação 5 na direção da síntese de ADP-glicose. Por fim, a porção glicose da ADP-glicose é transferida para a extremidade não-redutora (carbono 4) da glicose terminal de uma cadeia de amido em crescimento (Tabela 8.5, reação 7), completando, assim, a seqüência de reações.

A sacarose é sintetizada no citosol

O sítio da síntese da sacarose foi estudado por fracionamento celular, onde as organelas são isoladas e separadas umas das outras. Análises enzimáticas mostram que a síntese de sacarose ocorre no citosol a partir de trioses fosfato, por uma rota similar à rota de síntese do amido — ou seja, via frutose-1,6-bifosfato e glicose-1-fosfato (Figura 8.14 e Tabela 8.6, reações 2-6).

Na síntese de sacarose, a glicose-1-fosfato é convertida a UDP-glicose por intermédio de uma UDP-glicose fosforilase específica (Tabela 8.6, reação 7), análoga à ADP-glicose pirofosforilase dos cloroplastos. Nesse estágio, duas reações consecutivas completam a síntese da sacarose (Huber e Huber, 1996). Primeiro, a sacarose-6-fosfato sintase catalisa a reação da UDP-glicose com a frutose-6-fosfato, produzindo sacarose-6-fosfato e UDP (Tabela 8.6, reação 9). Segundo, a sacarose-6-fosfato fosfatase (fosfo-hidrolase) remove o fosfato da sacarose-6-fosfato, produzindo sacarose (Tabela 8.6, reação 10). Esta última reação, que é essencialmente irreversível, move a primeira reação na direção da síntese da sacarose.

Assim como na síntese do amido, o pirofosfato formado na reação catalisada pela UDP-glicose pirofosforilase (Tabela 8.6, reação 7) é hidrolisado, porém não imediatamente como nos cloroplastos. Em decorrência da ausência de uma pirofosfatase inorgânica, o pirofosfato pode ser utilizado por outras enzimas em

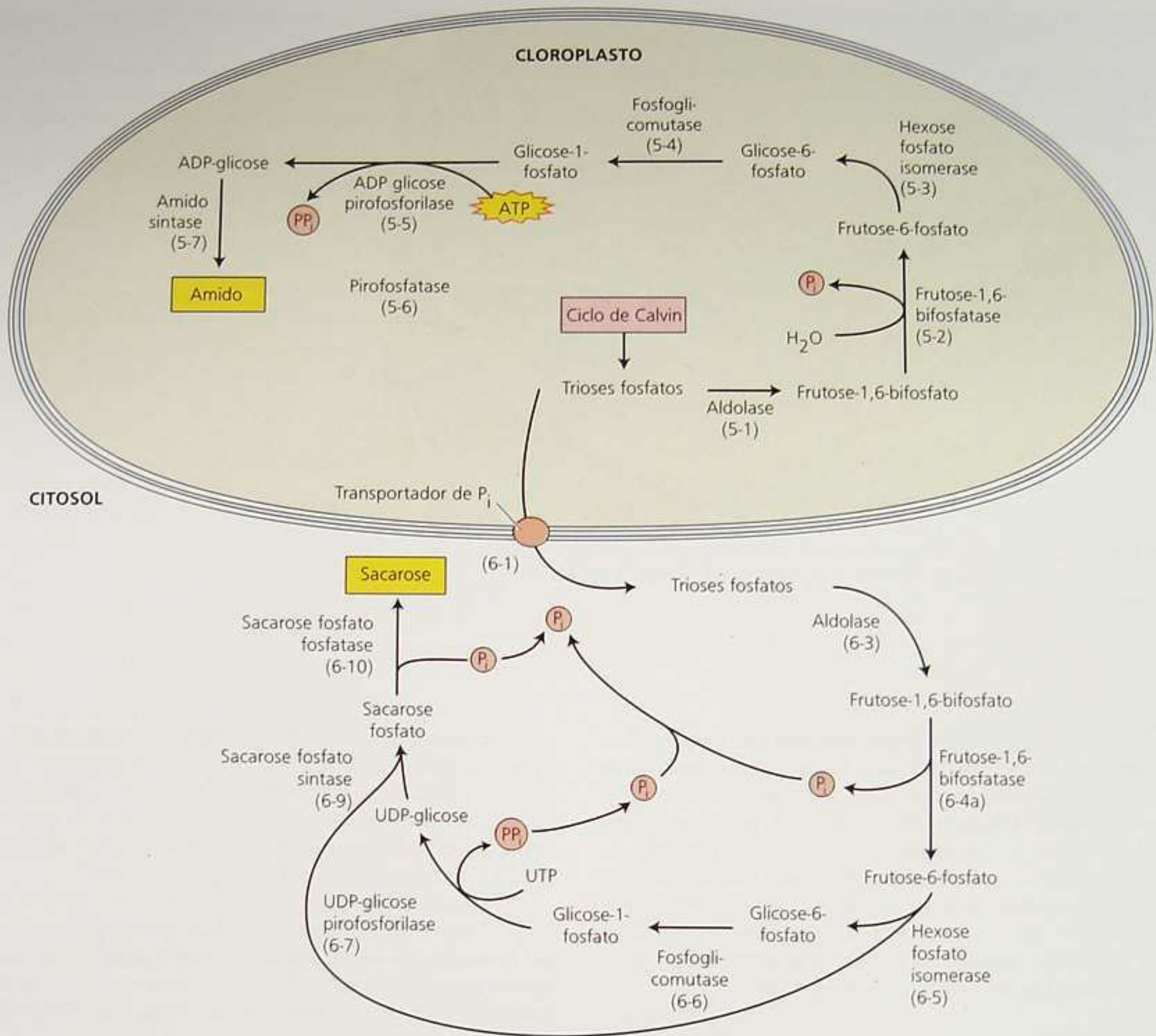



FIGURA 8.14 A síntese de amido e a sacarose são processos competidores que ocorrem no cloroplasto e no citosol, respectivamente. Quando a concentração de P_i citosólico é alta, a triose fosfato do cloroplasto é exportada para o citosol através de um transportador de P_i, em troca de P_i, e a sacarose é sintetizada. Quando a concentração citosólica de P_i é baixa, a triose fosfato é retida dentro do cloroplasto, e o amido é sintetizado. Os números junto às setas remetem às Tabelas 8.5 e 8.6.

reações de transfosforilação. Um exemplo é a frutose-6-fosfato fosfotransferase, uma enzima que catalisa uma reação do tipo da catalisada pela fosfofrutoquinase (Tabela 8.6, reação 4), exceto que o pirofosfato substitui o ATP como o doador fosforil.

Uma comparação das reações nas Tabelas 8.5 e 8.6 (conforme ilustrado na Figura 8.14) revela que a conversão das trioses fosfato a glicose-1-fosfato nas rotas que levam à síntese do amido e da sacarose possuem várias etapas em comum. Entretanto, tais rotas utilizam isoenzimas (diferentes formas de enzimas que catalisam a mesma reação) que são específicas ao cloroplasto ou citosol.

As isoenzimas apresentam propriedades marcadamente diferentes. Por exemplo, a frutose-1,6-bifosfatase do cloroplasto é regulada pelo sistema da tiorredoxina, mas não pela frutose-1,6-bifosfato e AMP. Por outro lado, a forma citosólica da enzima é regulada pela frutose-1,6-bifosfato (ver a próxima seção), sensível ao AMP, especialmente na presença de frutose-1,6-bifosfato, e não é afetada pela tiorredoxina.

Excetuado-se a frutose-1,6-bifosfatase do citosol, a síntese de sacarose é regulada em nível de sacarose fosfato sintase, uma enzima alostérica ativada pela glicose-6-fosfato e inibida pelo ortofosfato. A enzima é inativada no escuro pela fosforilação de um resíduo específico de serina via uma proteína quinase e ativada na luz pela desfosforilação via uma proteína fosfatase. A glicose-6-fosfato inibe a quinase, enquanto o P_i inibe a fosfatase.

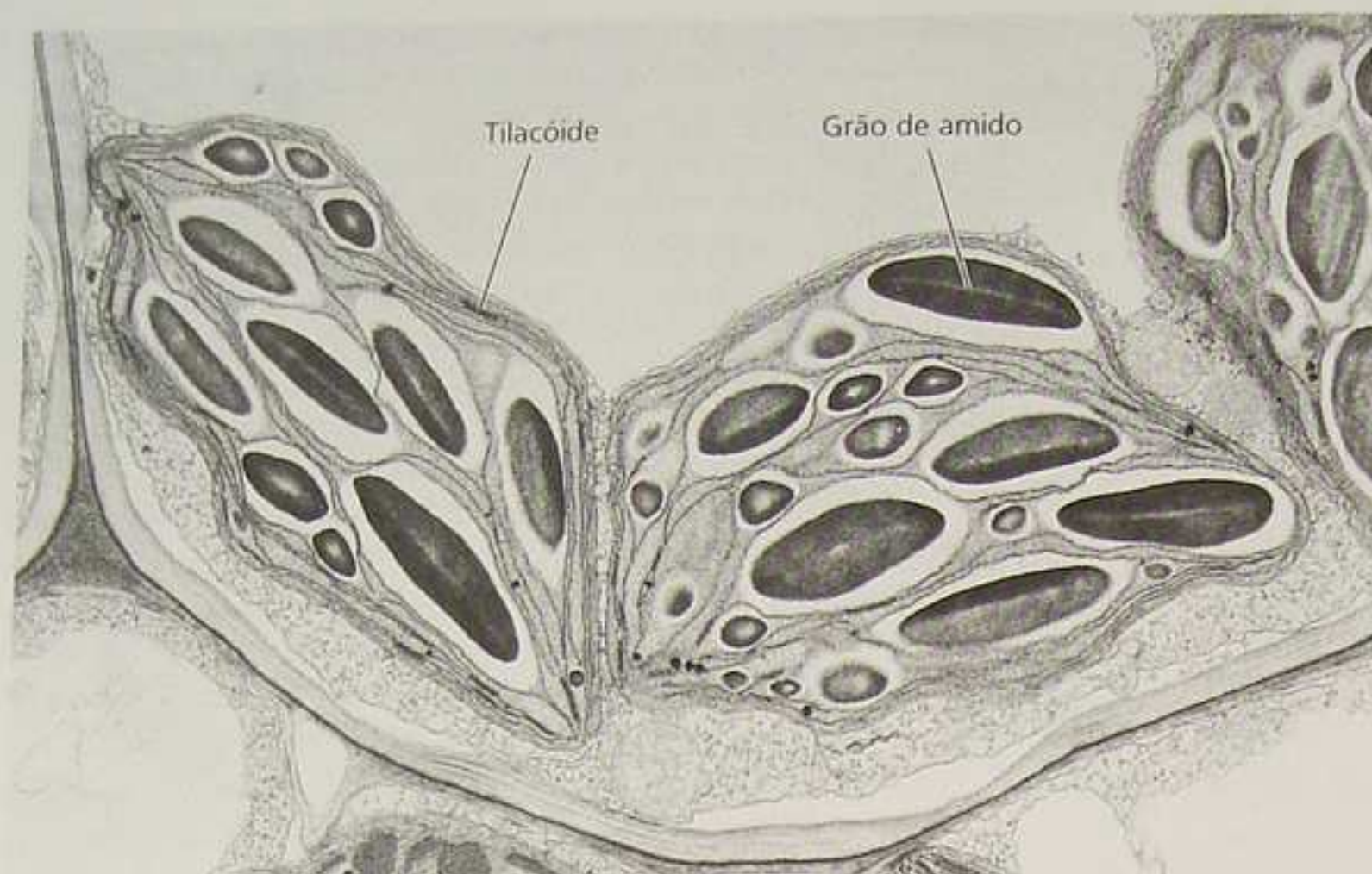



FIGURA 8.15 Electromicrografia de uma célula da bainha vascular de milho, mostrando os grãos de amido nos cloroplastos (15.800x) (fotografia por S.E. Frederick, cedida por E.H. Newcomb).

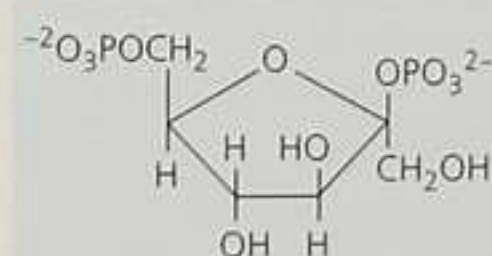
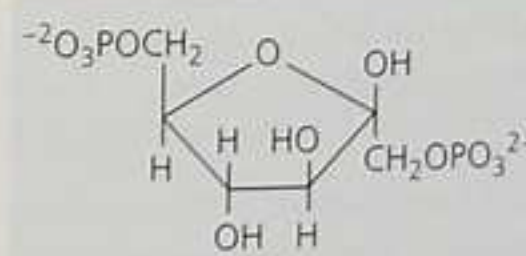
A recente purificação da glicose-6-fosfato fosfatase de folhas de arroz (Lund e cols., 2000) forneceu novas informações sobre as propriedades funcionais e moleculares dessa enzima. Tais resultados indicam que a sacarose-6-fosfato sintase e a sacarose-6-fosfatase existem como um complexo supramolecular apresentando atividade enzimática maior do que as atividades isoladas das enzimas constituintes (Salerno e cols., 1996). Essa interação não-covalente das duas enzimas envolvidas nas duas últimas etapas da síntese da sacarose aponta para uma nova característica regulatória do metabolismo dos carboidratos nas plantas.

As sínteses de sacarose e de amido são reações competitivas

As concentrações relativas de ortofosfato e triose fosfato são os principais fatores que controlam se o carbono fixado fotossinteticamente será compartimentado como amido no cloroplasto ou como sacarose no citosol. Os dois compartimentos comunicam-se um com o outro por meio do transportador fosfato/triose fosfato, também chamado de transportador de fosfato (ver Tabela 8.6, reação 1), um transportador do tipo antiporte estequiométrico estrito.

O transportador de fosfato catalisa o movimento de ortofosfato e de triose fosfato em direções opostas entre o cloroplasto e o citosol. Um baixa concentração de ortofosfato no citosol limita a exportação de triose fosfato do cloroplasto por intermédio do transportador, promovendo, assim, a síntese de amido. Por outro lado, uma abundância de ortofosfato no citosol inibe a síntese de amido dentro do cloroplasto e estimula a exportação de triose fosfato para o citosol, onde ela é convertida em sacarose.

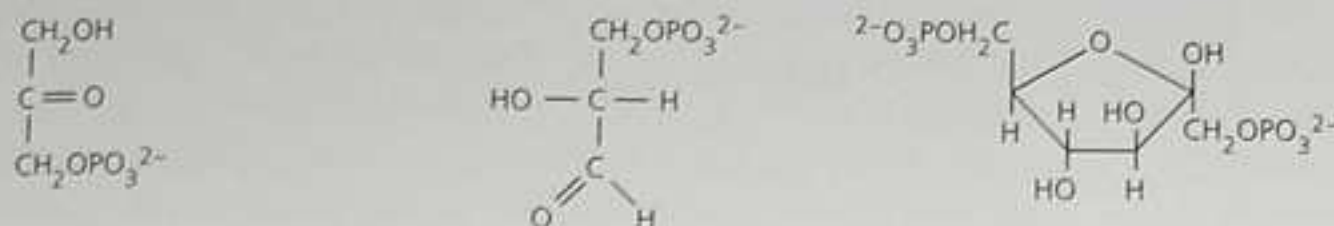
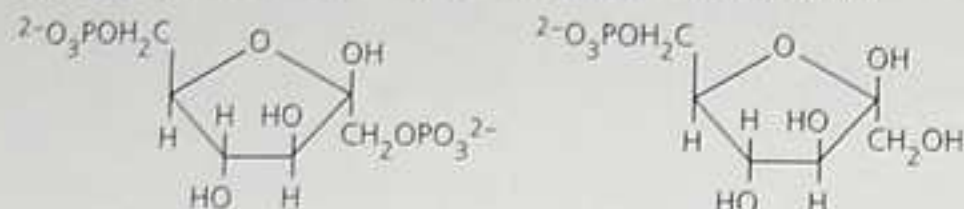
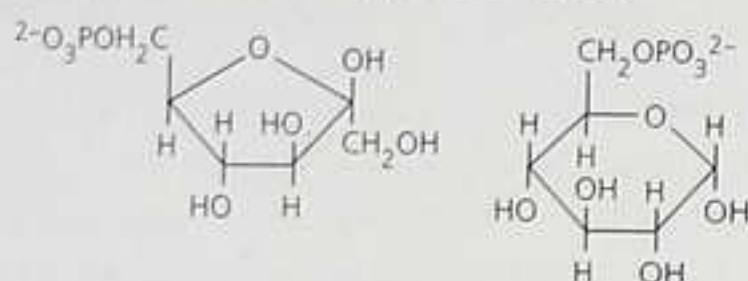
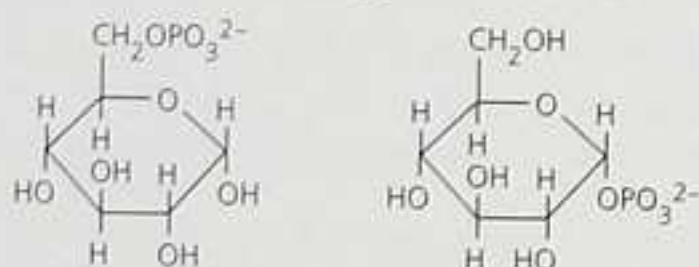
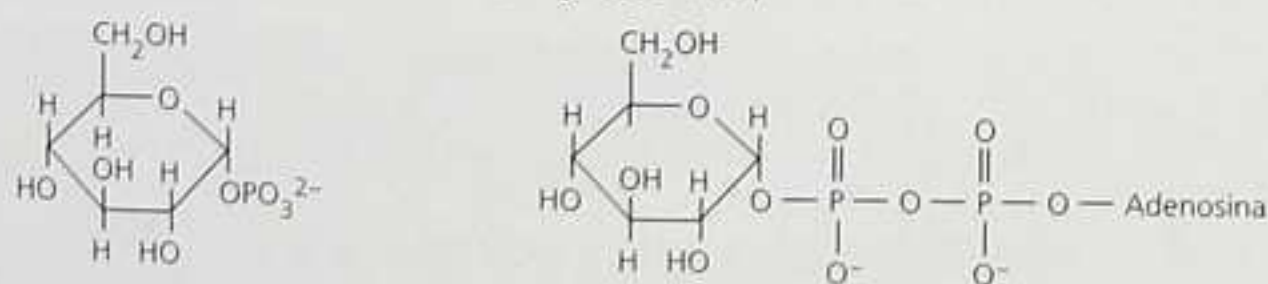
O ortofosfato e a triose fosfato controlam a atividade de várias enzimas reguladoras nas rotas biossintéticas da sacarose e do amido. A enzima ADP-glicose pirofosforilase (ver Tabela 8.5, reação 5) do cloroplasto é a enzima-chave que regula a síntese de amido a partir da glicose-1-fosfato. Essa enzima é estimulada por 3-fosfoglicerato e inibida por ortofosfato. Uma alta razão entre as concentrações de 3-fosfoglicerato e ortofosfato é tipicamente encontrada em cloroplastos iluminados que estejam ativamente sintetizando amido. Condições recíprocas prevalecem no escuro.

A frutose-1,6-bifosfato é uma molécula-chave de controle, a qual proporciona um aumento na síntese de sacarose na luz e uma redução no escuro. Ela é encontrada no citosol em concentrações diminutas e exerce um efeito regulatório na interconversão citosólica da frutose-1,6-bifosfato e frutose-6-fosfato (Huber, 1986; Stitt, 1990):

Frutose-2,6-bifosfato (um metabólito regulador)

Frutose-1,6-bifosfato (um metabólito intermediário)

O aumento na frutose-1,6-bifosfato citosólica está associado a taxas reduzidas de síntese de sacarose, pois a frutose-2,6-bifosfato é um forte inibidor da frutose-1,6-bifosfatase citosólica (ver Tabela 8.6, reação 4a) e um ativador da fosfofrutoquinase dependente do pirofosfato (ligada ao PP_i) (reação 4b). Mas o que, por sua vez, controla a concentração citosólica da frutose-2,6-bifosfato?

A frutose-2,6-bifosfato é sintetizada a partir da frutose-6-fosfato por uma frutose-6-fosfato 2-quinase especial (não confundir com a frutose-6-fosfato 1-quinase da glicólise) e é degradada especificamente pela frutose-2,6-bifosfatase (não confundir com a fru-

TABELA 8.5
Reações da síntese do amido no cloroplasto a partir da triose fosfato

1. *Frutose-1,6-bifosfato aldolase*
   Diidroxiacetona-3-fosfato + gliceraldeído-3-fosfato → frutose-1,6-bifosfato

2. *Frutose-1,6-bifosfatase*
   Frutose-1,6-bifosfato + H_2O → frutose-6-fosfato + P_i

3. *Hexose fosfato isomerase*
   Frutose-6-fosfato → glicose-6-fosfato

4. *Fosfoglicomutase*
   Glicose-6-fosfato → glicose-1-fosfato

5. *ADP-glicose pirofosforilase*
   Glicose-1-fosfato + ATP → ADP-glicose + PP_i

6. *Pirofosfatase*
   $PP_i + H_2O \rightarrow 2\ P_i + 2\ H^+$

7. *Amido sintase*
   ADP-glicose + $(1,4\text{-a-D-glicosil})_n$ → ADP + $(1,4\text{-a-D-glicosil})_{n+1}$

Extremidade não-redutora de uma cadeia de amido com *n* resíduos

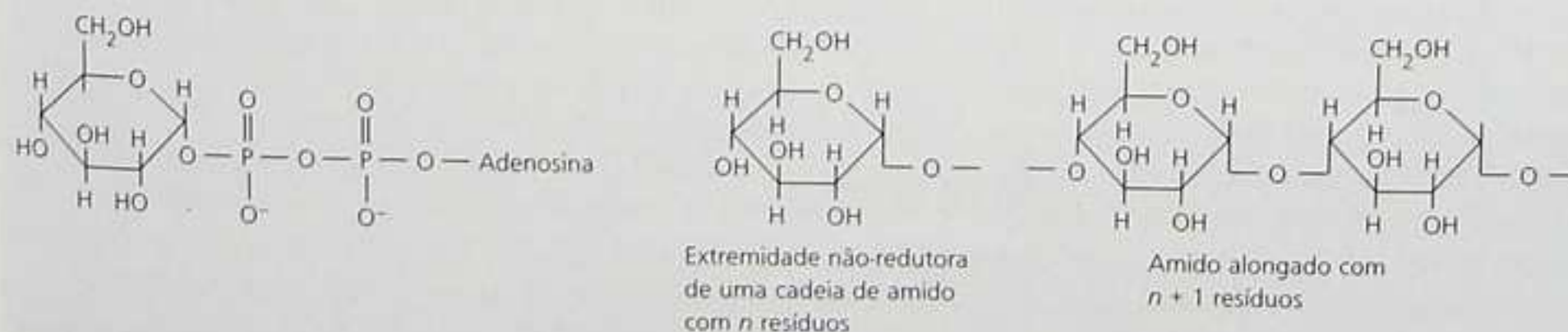
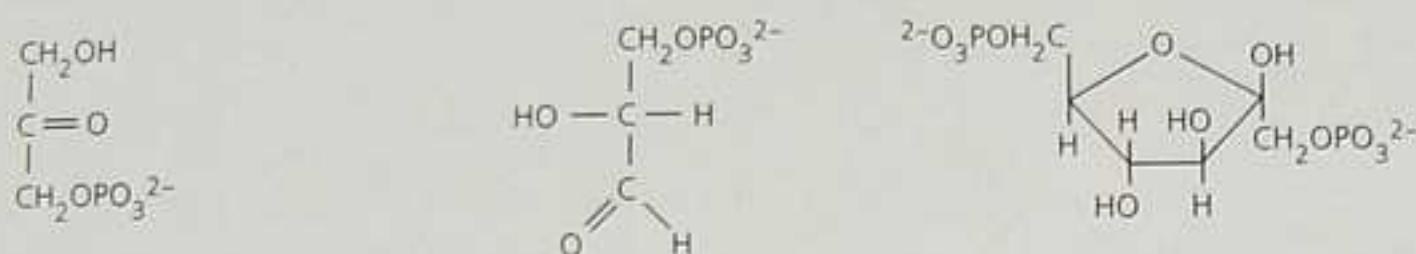
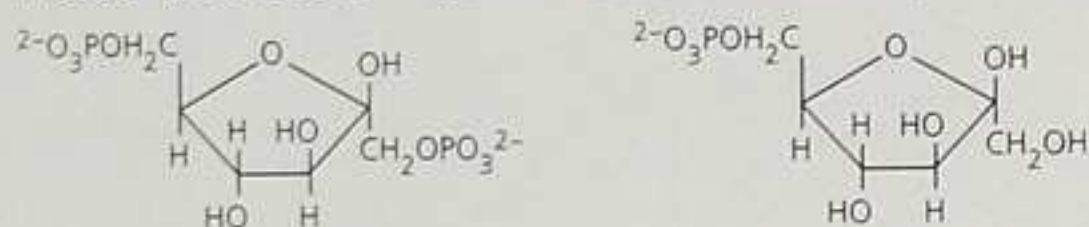
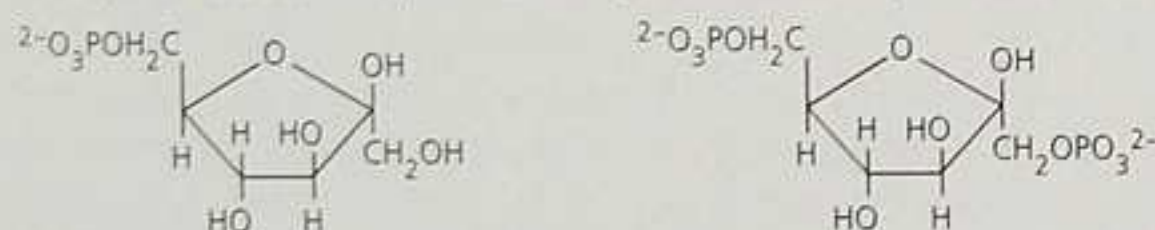
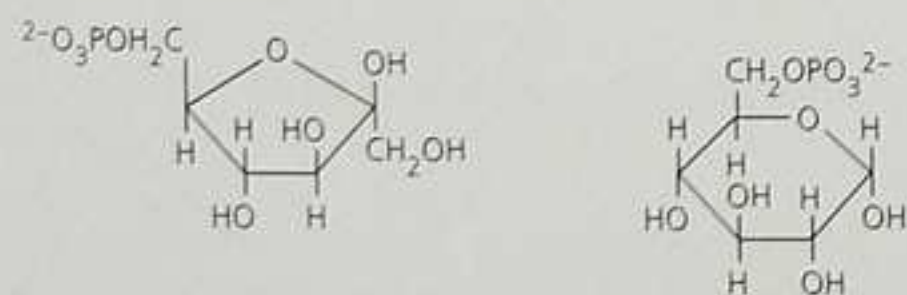
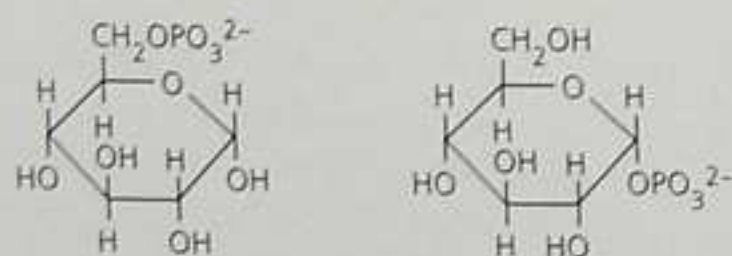
Amido alongado com *n* + 1 resíduos

Notas: A reação 6 é irreversível e "desvia" a reação precedente para a direita.
P_i e PP_i significam respectivamente, fosfato inorgânico e pirofosfato.

TABELA 8.6
Reações da síntese da sacarose no citosol a partir da triose fosfato

1. *Transportador Fosfato/triose*
Triose fosfato (cloroplasto) + P_i (citosol) → Triose fosfato (citosol) + P_i (cloroplasto)

2. *Triose fosfato isomerase*
Diidroxiacetona-3-fosfato → gliceraldeído-3-fosfato

CH_2OH | C=O | $CH_2OPO_3^{2-}$; $CH_2OPO_3^{2-}$ | HO—C—H | C(=O)H

3. *Frutose-1,6-bifosfato aldolase*
Diidroxiacetona-3-fosfato + gliceraldeído-3-fosfato → frutose-1,6-bifosfato

4a. *Frutose-1,6-bifosfatase*
Frutose-1,6-bifosfato + H_2O → frutose-6-fosfato + P_i

4b. *Fosfofrutoquinase ligada ao PP_i*
Frutose-6-fosfato + PP_i → frutose-1,6-bifosfato + P_i

5. *Hexose fosfato isomerase*
Frutose-6-fosfato → glicose-6-fosfato

6. *Fosfoglicomutase*
Glicose-6-fosfato → glicose-1-fosfato

7. *UDP-glicose pirofosforilase*
Glicose-1-fosfato + UTP → UDP-glicose + PP_i

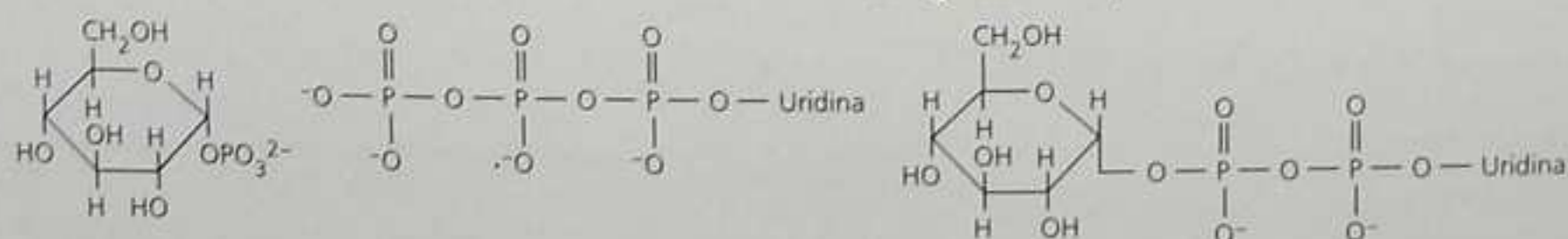
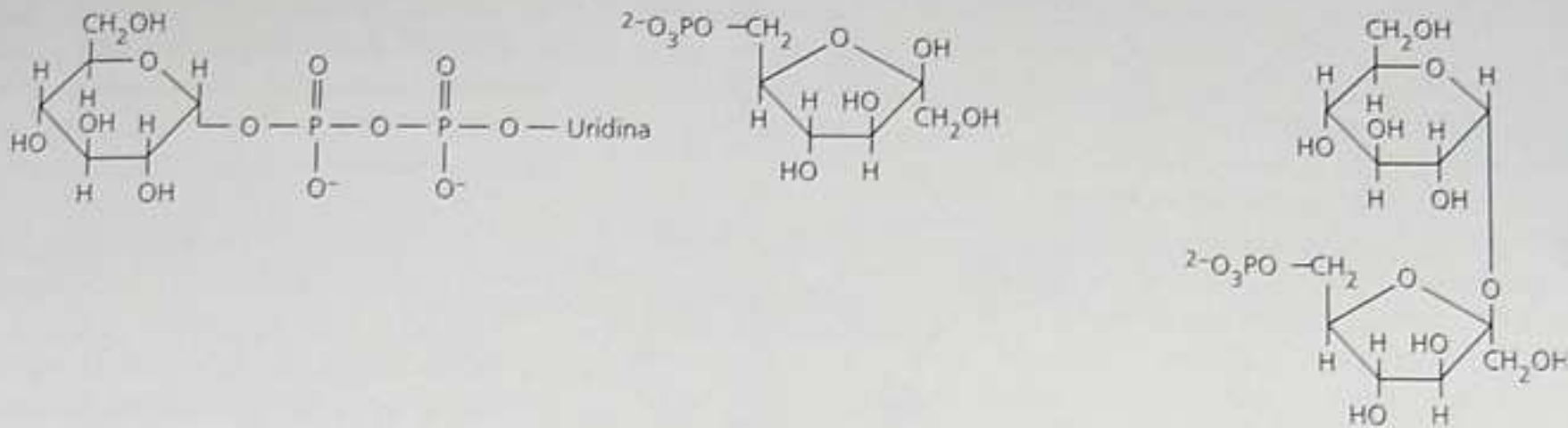
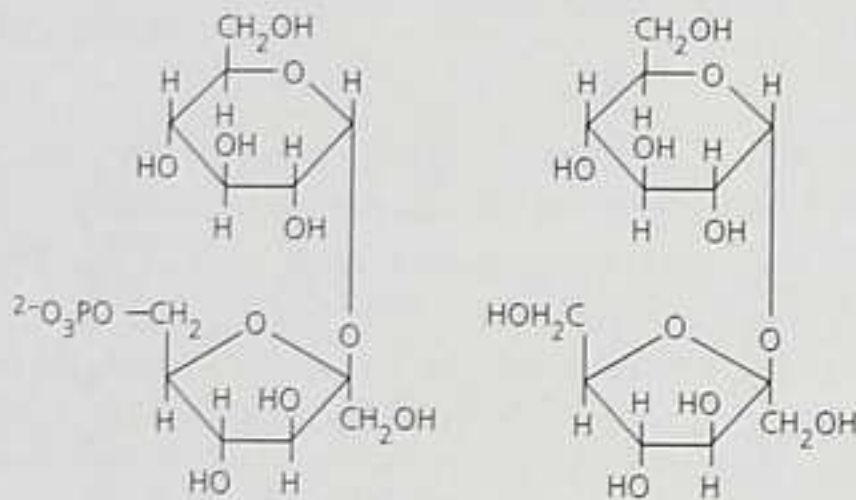



TABELA 8.6 (continuação)
Reações da síntese da sacarose no citosol a partir da triose fosfato

8. *Pirofosfatase*
$PP_i + H_2O \rightarrow 2\ P_i + 2\ H^+$

9. *Sacarose fosfato sintase*
UDP-glicose + frutose-6-fosfato → UDP + sacarose-6-fosfato

10. *Sacarose fosfato fosfatase*
Sacarose-6-fosfato + $H_2O \rightarrow$ sacarose + P_i

Notas: A reação 1 acontece na membrana interna do envoltório do cloropolasto. As reações 2 a 10 acontecem no citosol. A reação 8 é irreversível e "move" a reação precedente para a direita.
P_i e PP_i significam fosfato inorgânico e pirofosfato, respectivamente.

tose-1,6-bifosfatase do ciclo de Calvin). Evidências recentes sugerem que, assim como nas células animais, ambas as atividades da planta residem em uma única cadeia polipeptídica.

As atividades da quinase e da fosfatase são controladas pelo ortofosfato e pela triose fosfato. O ortofosfato estimula a frutose-6-fosfato 2-quinase e inibe a frutose-2,6-bifosfatase; a triose fosfato inibe a 2-quinase (Figura 8.16). Conseqüentemente, uma baixa razão citosólica entre triose fosfato e ortofosfato promove a formação de frutose-2,6-bifosfato, que, por sua vez, inibe a hidrólise da frutose-1,6-bifosfato citosólica e reduz a taxa de síntese da sacarose. Uma alta razão entre a triose fosfato e o ortofosfato tem o efeito oposto.

A luz regula a concentração desses ativadores e inibidores por intermédio das reações associadas com a fotossíntese e, assim, controla a concentração de frutose-2,6-bifosfato no citosol. A enzima glicolítica fosfofrutoquinase também funciona na conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato, mas nas plantas ela não é afetada apreciavelmente pela frutose-2,6-bifosfato.

A atividade da fosfofrutoquinase nas plantas parece ser regulada pelas concentrações relativas de ATP, ADP e AMP. A notável plasticidade das plantas foi mais uma vez ilustrada por recentes experimentos de deleção de genes em plantas de tabaco transformadas. Tais experiências mostram que as plantas transformadas podem crescer sem uma enzima frutose-6-fosfato quinase dependente do pirofosfato funcional. No caso, a conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato é aparentemente catalisada exclusivamente pela fosfofrutoquinase (Paul e cols., 1995).

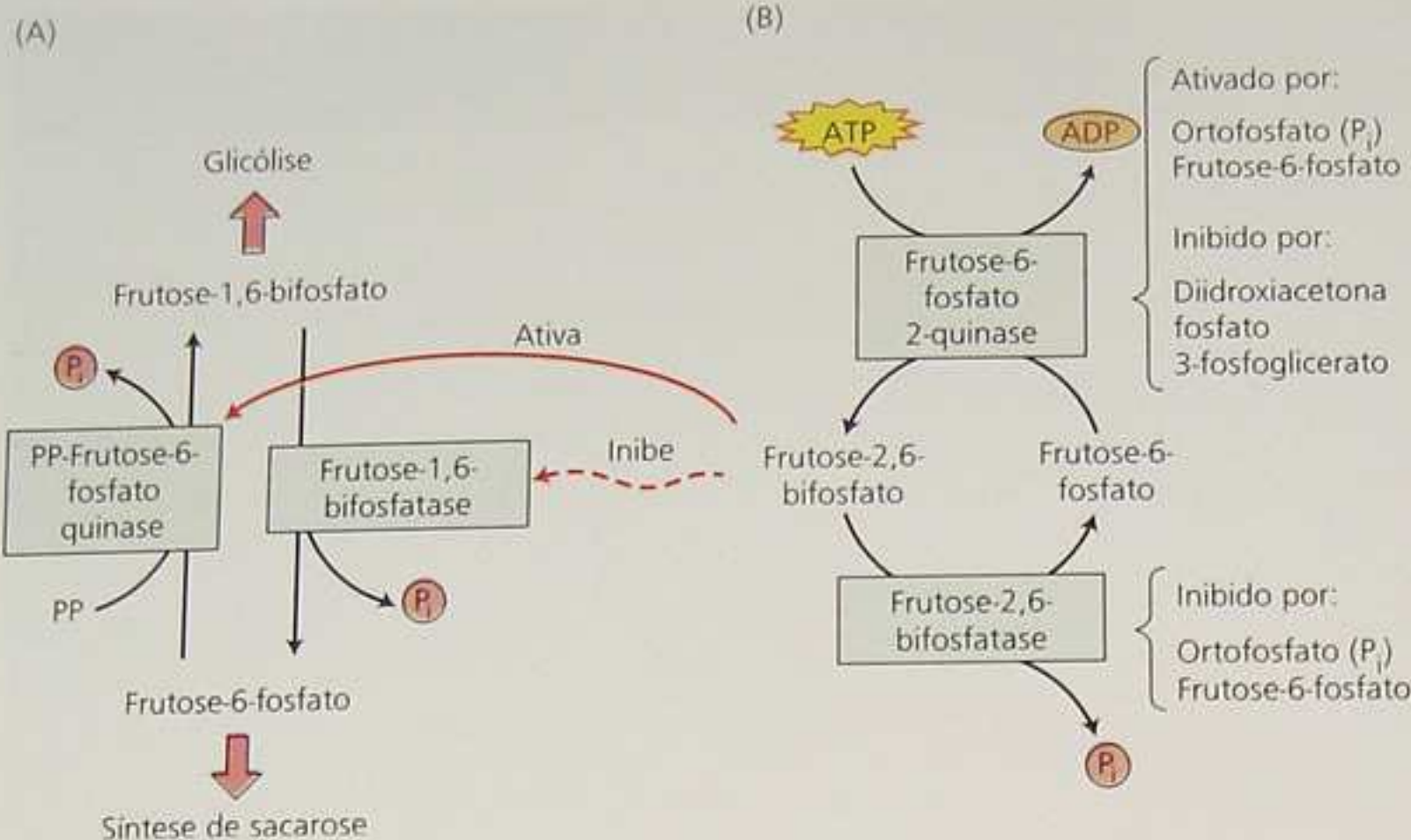



FIGURA 8.16 Regulação da interconversão citosólica da frutose-6-fosfato e frutose-1,6-bifosfato. (A) Os metabólitos-chave na alocação entre glicólise e síntese de sacarose. O metabólito regulador frutose-2,6-bifosfato regula a interconversão ao inibir a fosfatase e ativar a quinase, conforme mostra a figura. (B) A síntese de frutose-2,6-bifosfato está sob rígida regulação pelos ativadores e inibidores mostrados na figura.

RESUMO

A redução do CO_2 a carboidratos, por meio de reações da fotossíntese ligadas ao carbono, está acoplada ao consumo de NADPH e ATP sintetizado pelas reações luminosas das membranas dos tilacóides. O eucariontes fotossintetizantes reduzem o CO_2 via ciclo de Calvin, que ocorre no estroma, ou fase solúvel, dos cloroplastos. Aqui, CO_2 e água são combinados com a ribulose-1,5-bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, as quais são reduzidas e convertidas a carboidratos. A operação contínua do ciclo é garantida pela regeneração da ribulose-1,5-bifosfato. O ciclo de Calvin consome duas moléculas de NADPH e três moléculas de ATP para cada CO_2 fixado e, desde que tenha tais substratos, possui uma eficiência termodinâmica de 90%.

Vários sistemas dependentes da luz atuam em conjunto para regular o ciclo de Calvin: alterações iônicas (Mg^{2+} e H^+), metabólitos efetores (substratos enzimáticos) e sistemas mediados por proteínas (rubisco ativase, sistema ferredoxina-tiorredoxina).

O sistema de controle ferredoxina-tiorredoxina tem uma participação versátil ligando a luz à regulação de outros processos do cloroplasto, tais como a quebra dos carboidratos, fotofosforilação, biossíntese de ácidos graxos e tradução de mRNA. O controle dessas reações pela luz separa processos opostos biossintéticos e degradativos e, assim, minimiza o desperdício de recursos que ocorreria se os processos operassem ao mesmo tempo.

Rubisco, a enzima que catalisa a carboxilação da ribulose-1,5-bifosfato, atua também como oxigenase. Em ambos os casos, a enzima necessita ser carbamilada para ficar totalmente ativa. As reações de carboxilação e oxigenação ocorrem no sítio ativo da rubisco. Quando reage com o oxigênio, a rubisco produz 2-fosfoglicolato e 3-fosfoglicerato a partir da ribulose-1,5-bifosfato, em vez de dois 3-fosfoglicerato como quando reage com o CO_2, diminuindo, dessa forma, a eficiência da fotossíntese.

O ciclo oxidativo fotossintético C_2 recupera o carbono perdido como 2-fosfoglicolato pela atividade de oxigenase da rubisco. Os efeitos dissipáveis da fotorrespiração são evitados em algumas plantas, por mecanismos que concentram CO_2 nos sítios de carboxilação no cloroplasto. Tais mecanismos incluem um ciclo fotossintético C_4, metabolismo CAM, e "bombas de CO_2" de algas e cianobactérias.

Os carboidratos sintetizados no ciclo de Calvin são convertidos em formas de armazenagem de energia e carbono: sacarose e amido. A sacarose, a forma transportável de carbono e energia na maioria das plantas, é sintetizada no citosol, com sua síntese regulada pela fosforilação da sacarose fosfato sintase. O amido é sintetizado no cloroplasto. O balanço entre as rotas biossintéticas da sacarose e do amido é determinado pelas concentrações relativas dos efetores metabólicos (ortofosfato, frutose-6-fosfato, 3-fosfoglicerato e diidroxiacetona fosfato).

Tais efetores metabólicos funcionam no citosol por meio de enzimas que sintetizam e degradam a frutose-2,6-bisfosfato, o metabólito regulador que tem a função primária no controle da partição do carbono fotossinteticamente fixado entre a sacarose e o amido. Dois desses efetores, 3-fosfoglicerato e ortofosfato, também atuam na síntese de amido no cloroplasto, pela regulação alostérica da atividade da ADP-glicose pirofosforilase. Assim, a síntese de amido a partir da triose fosfato durante o dia pode ser separada de sua quebra durante a noite, a qual é necessária para fornecer energia para a planta.

Material da Internet

Tópicos da Internet

8.1 Como foi elucidado o ciclo de Calvin
Experimentos realizados na década de 1950 levaram à descoberta da rota de fixação do CO_2.

8.2 Rubisco: Uma enzima-modelo para estudos de estrutura e de função
Como a mais abundante enzima da Terra, a rubisco foi obtida em quantidades suficientes para elucidar sua estrutura e propriedades catalíticas.

8.3 Dióxido de carbono: algumas importantes propriedades físicas e químicas
As plantas adaptaram-se às propriedades do CO_2, alterando as reações que catalisam sua fixação.

8.4 Tiorredoxinas
Conhecidas primeiramente por regular as enzimas dos cloroplastos, as tiorredoxinas são agora conhecidas como participantes em processos de regulação em todos os tipos de células.

8.5 Rubisco ativase
A rubisco é a única entre as enzimas do ciclo de Calvin regulada por uma proteína específica, a rubisco ativase.

8.6 Operação do ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono
As enzimas do ciclo oxidativo fotossintético C_2 do carbono estão localizadas em três organelas diferentes.

8.7 Três variações do metabolismo C_4
Certas reações da rota fotossintética C_4 são diferentes entre espécies vegetais.

Ensaio da Internet

8.1 Modulação da fosfoenolpiruvato carboxilase nas plantas C_4 e CAM
A enzima de fixação de CO_2, fosfoenolpiruvato carboxilase, é regulada diferentemente em espécies C_4 e CAM.

Referências bibliográficas

Adams, P, Nelson, D. E., Yamada, S., Chmara, W., Jensen, R. G., Bohnert, H. J., and Griffiths, H. (1998) Tansley Review No. 97; Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol.* 138:171-190.

Bakrim, N., Brulfert, J., Vidal, J., and Chollet, R. (2001) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is controlled by a similar signaling cascade in CAM and C4 plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286: 1158-1162.

Beck, E., and Ziegler, P (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 9.5-118.

Besse, I., and Buchanan, B. B. (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: The new generation. *Bot. Bull. Acad. Sinica* 38:1-11.

Bonner, W., and Bonner, J. (1948) The role of carbon dioxide in acid formation by succulent plants. *Am. J. Bot.* 35: 113-117.

Buchanan, B. B. (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Phsyiol.* 31: 341-394.

Burnell, J. N., and Hatch, M. D. (1985) Light-lark modulation of leaf pyruvate, Pi dikinase. *Trends Biochem. Sci.* 10: 288-291.

Chollet, R., Vidal, J., and O'Leary, M. H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:273-298.

Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Vidal, J., and Pierre J.-N. (2000) An increase in the phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C4 phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH_4Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant J.* 23: 497-506.

Craig, S., and Goodchild, D. J. (1977) Leaf ultrastructure of *Triodia irritans*: A C4 grass possessing an unusual arrangement of photosynthetic tissues. *Aust. J. Bot.* 25: 277-290.

Cushman, J. C. (2001) Crassulacean acid metabolism: A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* 127: 1439-1448.

Dai, S., Schwendtmayer, C., Schurmann, P., Ramaswamy, S., and Eklund, H. (2000) Redox signaling in chloroplasts: Cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science* 287: 655-658.

Dever, L. V, Bailey K. J., Lacuesta, M., Leegood, R. C., and Lea P J. (1996) The isolation and characterization of mutants of the C_4 plant *Amaranthus edulis*. *Comp. Rend. Acad. Sci., III.* 919-959.

Drincovich, M. F., Casati, P, and Andreo, C. S. (2001) NADP-malic enzyme from plants: A ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett.* 490:1-6.

Edwards, G. E., and Walker, D. (1983) C3, C4: *Mechanisms and Cellular and Environmental Regulation of Photosynthesis*. University of California Press, Berkeley.

Flügge, U. I., and Heldt,. H. W. (1991) Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 129-144.

Frederick, S. E., and Newcomb, E. H. (1969) Cytochemical localization of catalase in leaf microbodies (peroxisomes). *J. Cell Biol.* 43: 343-353.

Giglioli-Guivarc'h, N., Pierre, J.-N., Brown, S., Chollet, R., Vidal, J., and Gadal, P (1996) The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C_4 phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant Cell* 8: 573-586.

Hatch, M. D., and Slack, C. R. (1966) Photosynthesis by sugarcane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.* 101: 103-111.

Heldt, H. W. (1979) Light-dependent changes of stromal H^+ and Mg^{2+} concentrations controlling CO_2 fixation. In *Photosynthesis II (Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, vol. 6) M. Gibbs and E. Latzko, eds. Springer, Berlin, pp. 202-207.

Huber, S. C. (1986) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:233-246.

Huber, S. C., and Huber, J. L. (1996) Role and regulation of sucrosephosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:431-444.

Kozaki, A., and Takeba, G. (1996) Photorespiration protects C_3 plants from photooxidation. *Nature* 384: 557-560.

Ku, S. B., and Edwards, G. E. (1978) Oxygen inhibition of photosynthesis. III. Temperature dependence of quantum yield and its relation to O_2/CO_2 solubility ratio. *Planta* 140: 1-6.

Leegood, R. C. Lea, P. J., Adcock, M. D., and Haeusler, R. D. (1995) The regulation and control of photorespiration. *J. Exp. Bot.* 46: 1397-1414.

Lorimer, G. H. (1981) The carboxylation and oxygenation of ribulose 1,5-bisphosphate: The primary events in photosynthesis and photorespiration. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32 349-383.

Lorimer G. H. (1983) Ribulose-1,5-bisphosphate oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 507-535.

Lund, J. E., Ashton, A. R., Hatch, M. D., and Heldt, H. W. (2000) Purification, molecular cloning, and sequence analysis of sucrose-6F-phosphate phosphohydrolase from plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12914-12919.

Lüttge, U., and Higinbotham, N. (1979) *Transport in Plants*. SpringerVerlag, New York.

Maier, R. M., Neckermann, K., Igloi, G. L., and Koessel, H. (1995) Complete sequence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* 251: 614-628.

Maroco, J. P, Ku, M. S. B., Lea P J., Dever, L. V, Leegood, R. C., Furbank, R. T, and Edwards, G. E. (1998) Oxygen requirement and inhibition of C_4 photosynthesis: An analysis of C_4 plants deficient in the C_3 and C_4 cycles. *Plant* Physiol.116: 823-832.

Capítulo

9 Fotossíntese: considerações fisiológicas e ecológicas

A CONVERSÃO DA ENERGIA SOLAR em energia química de compostos orgânicos é um processo complexo que inclui transporte de elétrons e metabolismo do carbono fotossintético (ver Capítulos 7 e 8). Discussões anteriores das reações fotoquímicas e bioquímicas da fotossíntese não deveriam obscurecer o fato que, sob condições naturais, o processo fotossintético ocorre em organismos intactos que estão continuamente respondendo a mudanças internas e externas. Este capítulo direciona algumas das respostas fotossintéticas da folha intacta ao seu ambiente. As respostas fotossintéticas adicionais a tipos diferentes de estresses estão contempladas no Capítulo 25.

O impacto do ambiente sobre a fotossíntese é de interesse tanto de fisiologistas quanto de agrônomos. Do ponto de vista fisiológico, deseja-se compreender como a fotossíntese responde a fatores ambientais como luz, concentrações de CO_2 no ambiente e na temperatura. A dependência de processos fotossintéticos em relação ao ambiente é também importante para os agrônomos, pois a produtividade vegetal e, em conseqüência, o rendimento do cultivo dependem muito das taxas fotossintéticas prevalecentes em uma ambiente dinâmico.

No estudo da dependência ambiental da fotossíntese surge uma questão central: como muitos fatores ambientais podem limitar a fotossíntese em um determinado tempo? O fisiologista vegetal britânico F. F. Blackman formulou, em 1905, uma hipótese segundo a qual, sob algumas condições particulares, a taxa de fotossíntese é limitada pela etapa mais lenta, o chamado *fator limitante*.

A implicação dessa hipótese é que, a um determinado tempo, a fotossíntese pode ser limitada pela luz ou pela concentração de CO_2, mas não por ambos os fatores. Tal hipótese tem tido uma influência marcante sobre a abordagem usada por fisiologistas vegetais no estudo da fotossíntese, ou seja, variar um fator e manter constantes todas as demais condições ambientais.

TABELA 9.1
Algumas características de limitações à taxa de fotossíntese

	Condições que levam a esta limitação		Resposta da fotossíntese sob esta limitação a		
Fator limitante	CO_2	Luz	CO_2	O_2	Luz
Atividade da rubisco	Baixa	Alta	Forte	Forte	Ausente
Regeneração da RuBP	Alta	Baixa	Moderada	Moderada	Forte

Na folha intacta, três etapas metabólicas principais têm sido identificadas como importantes para a *performance* fotossintética ótima:

1. Atividade da rubisco
2. Regeneração da ribulose bifosfato (RuBP)
3. Metabolismo das trioses fosfato.

As duas primeiras etapas são as que prevalecem sob condições naturais. A Tabela 9.1 fornece alguns exemplos de como a luz e o CO_2 podem afetar essas etapas metabólicas-chave. Nas seções seguintes, são discutidos em detalhe aspectos biofísicos, bioquímicos e ambientais da fotossíntese em folhas.

LUZ, FOLHAS E FOTOSSÍNTESE

A escala do cloroplasto (o ponto central dos Capítulos 7 e 8) até a folha adiciona novos níveis de complexidade para a fotossíntese. Ao mesmo tempo, as propriedades estruturais e funcionais da folha possibilitam outros níveis de regulação.

Examinar-se-á, de início, como a anatomia foliar e os movimentos nos cloroplastos e nas folhas controlam a absorção de luz para a fotossíntese. Após, serão descritos como os cloroplastos e as folhas adaptam-se ao seu ambiente de luz e como a resposta fotossintética de folhas crescendo sob pouca luz reflete a sua adaptação a ambientes em tais condições. As folhas adaptam-se também às condições de luminosidade alta, mostrando que as plantas são fisiologicamente flexíveis e que se adaptam de imediato ao seu ambiente.

As quantidades de luz e de CO_2 determinam a resposta fotossintética das folhas. Em algumas situações, a fotossíntese é limitada por um suprimento inadequado de luz ou CO_2. Em outras situações, a absorção demasiada de luz pode provocar problemas sérios, razão pela qual mecanismos especiais protegem o sistema fotossintético de luz excessiva. Os níveis múltiplos de controle da fotossíntese permitem às plantas crescer com êxito em um ambiente em constante mudança e em habitats diferentes.

CONCEITOS E UNIDADES NA MEDIÇÃO DA LUZ

Três parâmetros são sobremaneira importantes na medição de luz: (1) a qualidade espectral, (2) a quantidade e (3) a direção. A qualidade espectral foi discutida no Capítulo 7 (ver Figuras 7.2 e 7.3 e **Tópico 7.1 na Internet**). Uma discussão sobre a quantidade e a direção de luz que chega até as plantas precisa considerar a geometria da parte da planta que recebe a luz: o órgão da planta é plano ou cilíndrico?

Os sensores de luz planos são os mais apropriados para folhas planas. A luz que chega à planta pode ser medida como energia; a quantidade de energia que incide sobre um sensor plano de área conhecida, por unidade de tempo, é quantificada como **irradiância** (ver Tabela 9.2). As unidades podem ser expressas em termos de energia, como watts por metro quadrado ($W\ m^{-2}$). O tempo (segundos) está contido no termo watt: 1 W = 1 joule (J) s^{-1}.

TABELA 9.2
Conceitos e unidades para a quantificação da luz

	Medições de energia ($W\ m^{-2}$)	Medições de fótons ($mol\ m^{-2}s^{-1}$)
Sensor de luz plano	Irradiância Radiação fotossinteticamente ativa (PAR, 400-700 nm, unidades de energia)	Irradiância de fótons PAR (unidades de *quantum*)
	—	Densidade fotossintética de fluxo fotônico (PPFD)
Sensor de luz esférico	Taxa de fluência (unidades de energia) Irradiância escalar	Taxa de fluência (unidades de *quantum*) Irradiância escalar quântica

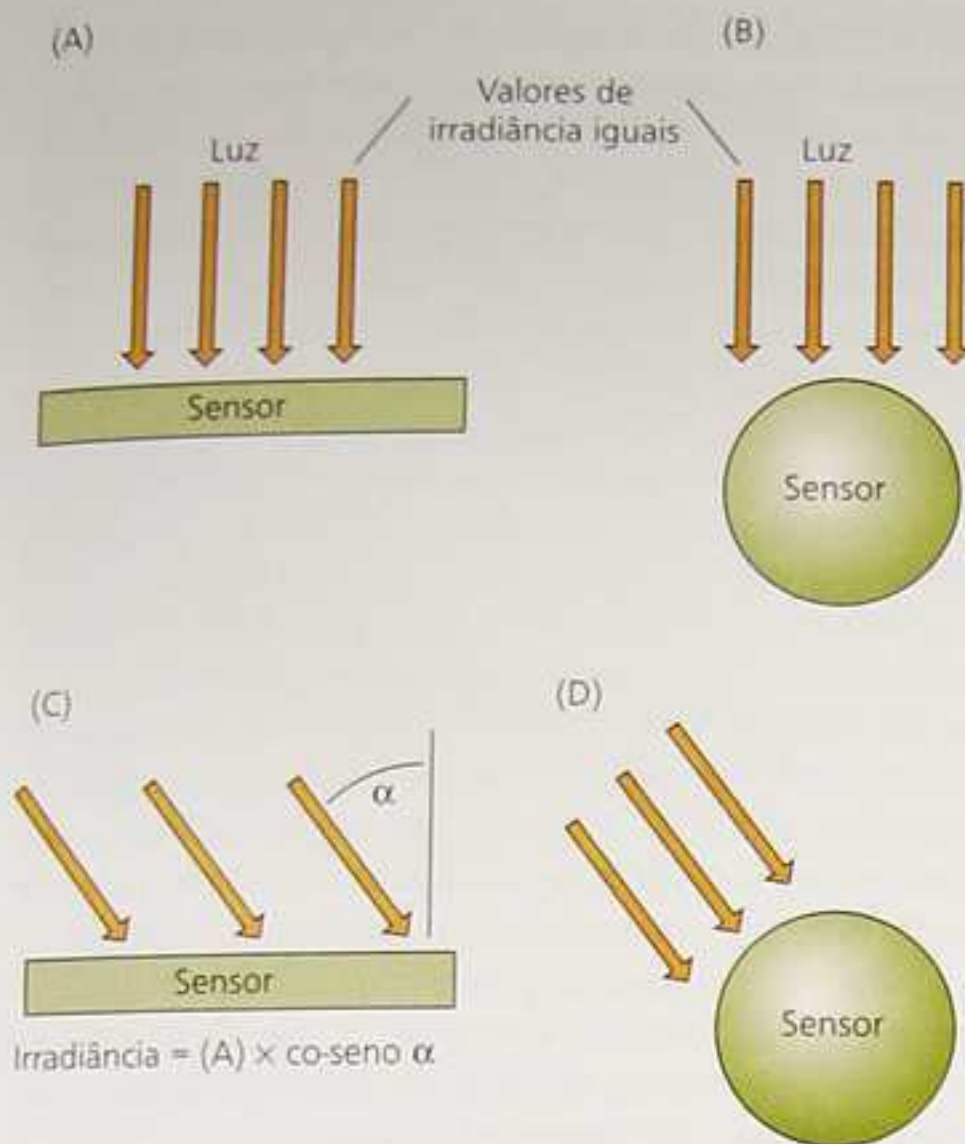



FIGURA 9.1 Sensores de luz plano e esférico. Quantidades equivalentes de luz colimada atingem um sensor plano do tipo irradiância (A) e um sensor esférico (B) que mede a taxa de fluência. Com luz colimada, A e B darão as mesmas leituras de luz. Quando a direção da luz é alterada em 45°, o sensor (D) medirá a mesma quantidade que em B. Por outro lado, o sensor de irradiância plano (C) medirá uma quantidade equivalente à irradiância em A multiplicada pelo coseno do ângulo a em C (segundo Björn e Vogelmann, 1994).

A luz também pode ser medida como o número de **quanta** incidentes (*quantum*, no singular). Neste caso, as unidades podem ser expressas em moles por metro quadrado por segundo (mol $m^{-2} s^{-1}$), onde *moles* referem-se ao número de fótons (1 mol de luz = $6{,}02 \times 10^{23}$ fótons, número de avogadro). Essa medida é chamada de **irradiância de fótons.** As unidades de *quanta* e de energia podem ser interconvertidas com relativa facilidade, desde que o comprimento de onda da luz, λ, seja conhecido. A energia de um fóton está relacionada ao seu comprimento de onda, conforme a equação:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

onde *c* é a velocidade da luz (3×10^8 m s^{-1}), *h* é a constate de Planck ($6{,}63 \times 10^{-34}$ J s) e λ é o comprimento de onda da luz, geralmente expresso em nm (1 nm = 10-9 m). A partir dessa equação, pode ser demonstrado que um fóton a 400 nm tem duas vezes mais energia do que um fóton a 800 nm (ver **Tópico 9.1 na Internet**).

Agora, nossa atenção voltar-se-á em direção da luz, que pode atingir diretamente uma superfície plana, de cima ou obliquamente. Quando a luz desvia da perpendicular, a irradiância é proporcional ao co-seno do ângulo com que o raio luminoso atinge o sensor (Figura 9.1).

Existem muitos exemplos na natureza em que o objeto que intercepta a luz não é plano (p. ex., partes aéreas complexas, plantas inteiras, cloroplastos). Além disso, em algumas situações a luz pode vir simultaneamente de muitas direções (p. ex., a luz direta do sol mais a luz refletida da areia, solo ou neve). Em tais situações, faz mais sentido medir a luz com um sensor esférico, que realiza medições em todas as direções.

A denominação dessa medição em todas as direções é **taxa de fluência** (ver Tabela 9.2) (Rupert e Letarjet, 1978) e essa quantidade pode ser expressa em watts por metro quadrado (W m^{-2}) ou moles por metro quadrado por segundo (mol $m^{-2} s^{-1}$). As unidades indicam claramente se a luz está sendo medida como energia (W) ou como fótons (mol).

Ao contrário da sensibilidade para a luz de um sensor plano, a sensibilidade de um sensor esférico é independente da direção (ver Figura 9.1). Dependendo se a luz é colimada (os raios são paralelos) ou difusa (os raios movimentam-se em direções aleatórias), os resultados da taxa de fluência *versus* irradiância medida com um sensor plano ou esférico podem fornecer valores diferentes (ver Figura 9.1) (para uma discussão detalhada, ver Björn e Vogelmann, 1994).

A **radiação fotossinteticamente ativa (PAR,** 400 a 700 nm) pode também ser expressa em termos de energia (W m^{-2}) ou *quanta* (mol $m^{-2} s^{-1}$) (McCree, 1981). Observe que a PAR é uma medição do tipo irradiância. Em pesquisa sobre fotossíntese, quando a PAR é expressa sobre uma base quântica, é adotada a denominação especial **fóton fotossintético de densidade de fluxo (PPFD).** Contudo, tem sido sugerido que o termo *densidade* seja abandonado, pois, segundo o Sistema Internacional de Unidades, a palavra pode significar área ou volume.

Resumindo, ao escolher como quantificar a luz, é importante confrontar a geometria do sensor e a resposta espectral com a da planta. Os sensores planos com co-seno corrigido são perfeitamente adequados para medir a quantidade de luz que atinge a superfície da folha; sensores esféricos são mais apropriados em outras situações, como em estudos de uma suspensão de cloroplasto ou um ramo de uma árvore (ver Tabela 9.2).

Quanta luz existe em um dia ensolarado e qual é a relação entre irradiância da PAR e sua taxa de fluência? Sob a luz solar direta, a irradiância da PAR e a taxa de fluência são de mais ou menos 2.000 μmol $m^{-2} s^{-1}$, mas valores mais altos podem ser medidos em grandes altitudes. O valor correspondente em unidades de energia é de cerca de 400 W m^{-2}.

A anatomia foliar maximiza a absorção da luz

Cerca de 1,3 kW m^{-2} de energia radiante do sol alcança a Terra, mas apenas aproximadamente 5% desta energia pode ser convertida em carboidratos pela folha fotossintetizante (Figura 9.2). A razão dessa percentagem tão baixa é que uma fração maior da luz incidente tem um comprimento de onda demasiadamente curto ou longo excessivamente para ser absorvido pelos pigmentos fotossintéticos (ver Figura 7.3). Uma fração expressiva da energia luminosa absorvida é perdida como calor e uma quantidade menor é perdida como fluorescência (ver Capítulo 7).

No Capítulo 7 foi explicado que a energia radiante do sol consiste de diferentes comprimentos de onda de luz. Apenas os fótons de comprimentos de onda de 400 a 700 nm são utilizados na fotossíntese e cerca de 85 a 90% dessa PAR é absorvida pela folha; o restante é refletido na superfície foliar ou transmitido através da folha (Figura 9.3). Visto que a clorofila tem grande absorção nas faixas do azul e do vermelho do espectro (ver Figura 7.3), as luzes

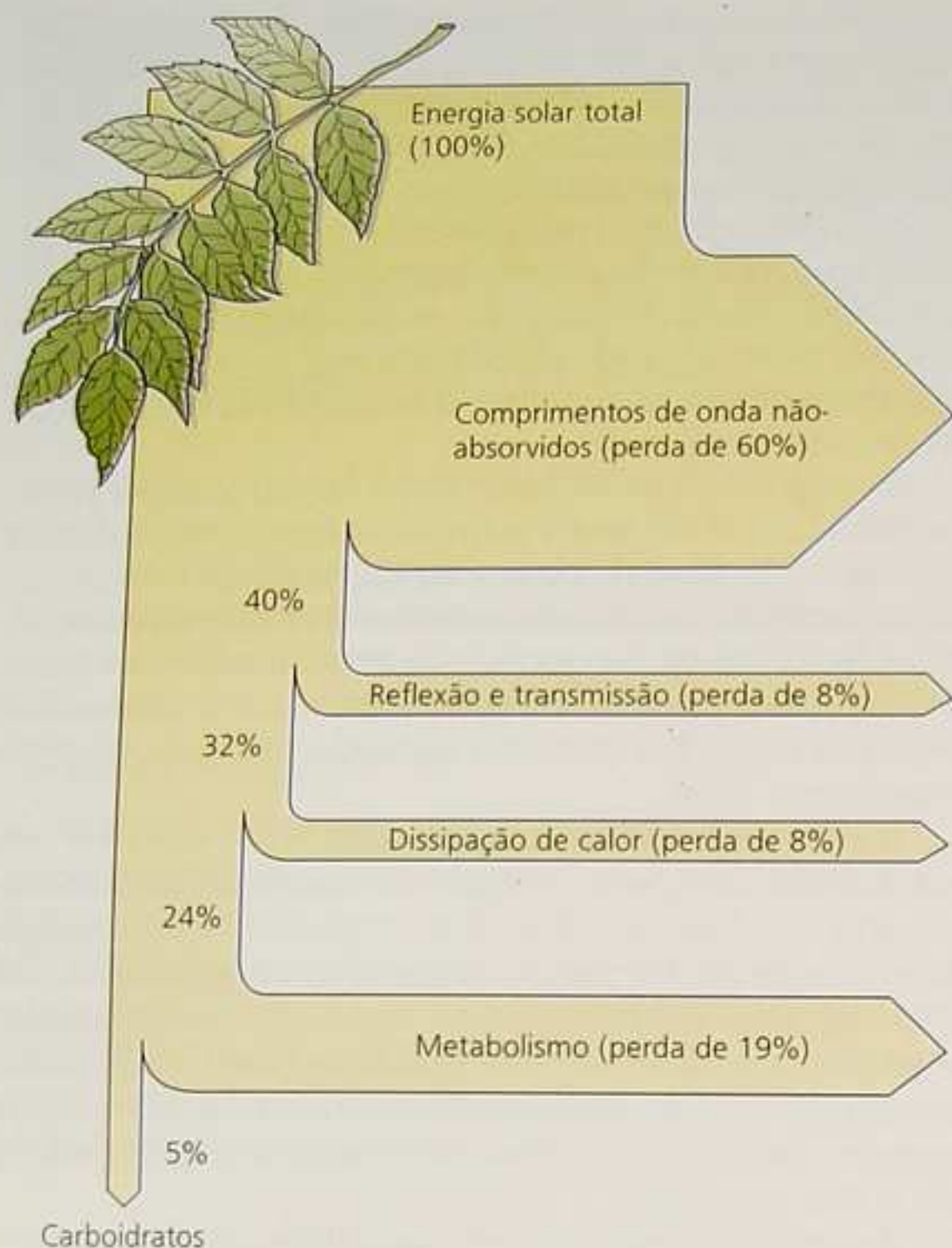



FIGURA 9.2 Conversão de energia solar em carboidratos por uma folha. Da energia total incidente, apenas 5% é convertido em carboidratos.

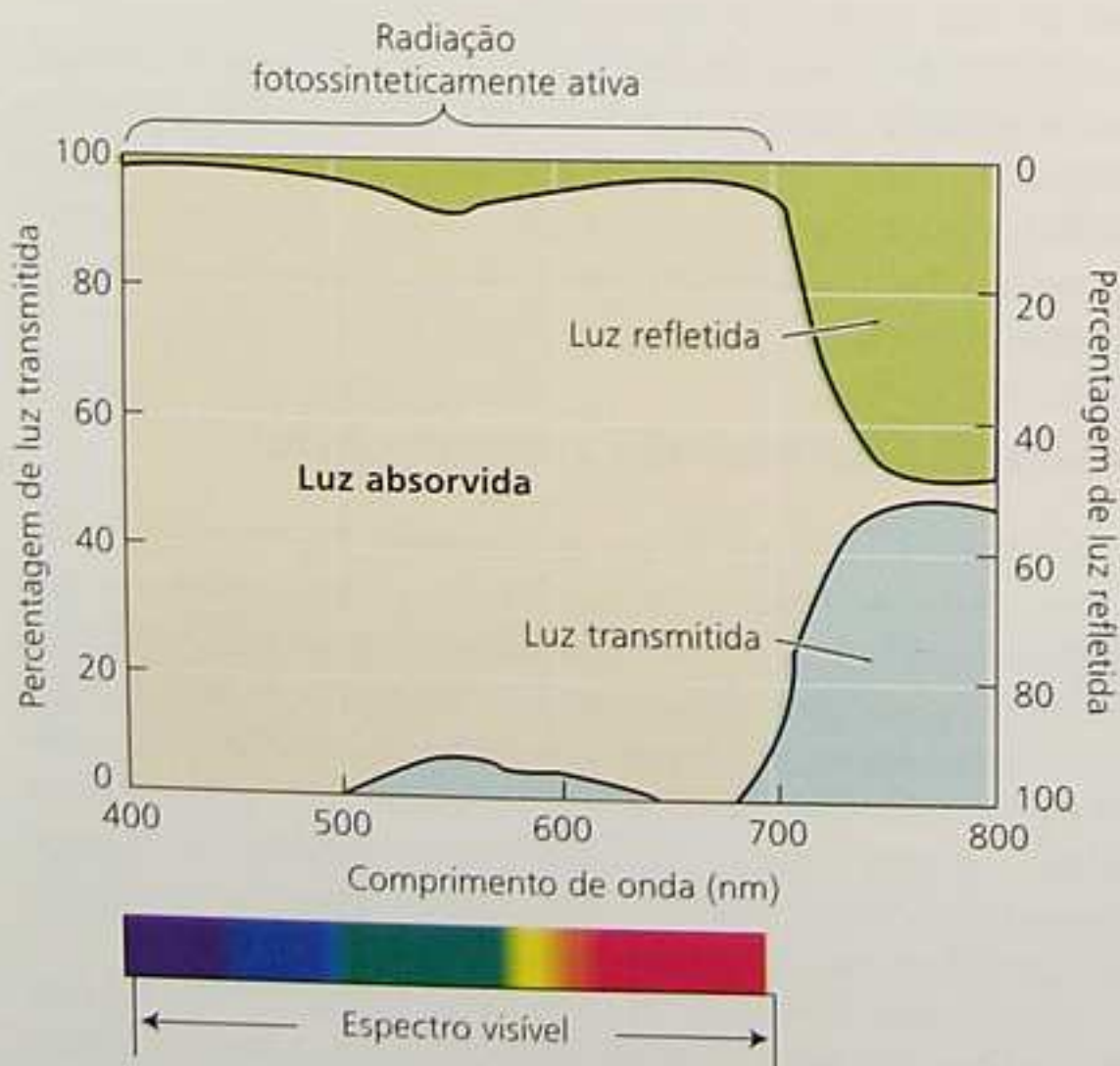



FIGURA 9.3 Propriedades ópticas de uma folha de feijoeiro, sendo mostradas as porcentagens de luz absorvida, refletida e transmitida, como função do comprimento de onda. A luz verde, transmitida e refletida na faixa de 500 a 600 nm, dá a cor verde às folhas. Observe que a maior parte da luz acima de 700 nm não é absorvida pela folha (Smith, 1986).

transmitidas e refletidas são amplamente enriquecidas em verde — por isso, a cor verde da vegetação.

A anatomia da folha é altamente especializada para a absorção de luz (Terashima e Hikosaka, 1995). A camada celular mais externa, a epiderme, é tipicamente transparente à luz visível e suas células são, com freqüência, convexas. As células epidérmicas convexas podem atuar como lentes e concentrar a luz, de modo que a quantidade que atinge alguns dos cloroplastos pode ser muitas vezes maior do que a quantidade da luz do ambiente (Vogelmann e cols., 1996). A concentração epidérmica de luz é comum em plantas herbáceas e especialmente proeminente em plantas tropicais de sub-bosque florestal, onde os níveis de luz são muito baixos.

Sob a epiderme, encontram-se camadas de células fotossintéticas que constituem o **parênquima paliçádico;** semelhantes a pilares dispostas em colunas paralelas de uma a três camadas de profundidade (Figura 9.4). Algumas folhas têm várias camadas de células paliçádicas colunares, podendo ser questionado se é eficiente para uma planta investir energia no desenvolvimento de múltiplas camadas celulares, quando o alto conteúdo de clorofila da primeira camada parece permitir pouca transmissão da luz incidente para o interior da folha. De fato, mais luz do que poderia ser esperado penetra na primeira camada do tecido paliçádico, por causa do efeito peneira e da canalização da luz.

O **efeito peneira** acontece porque a clorofila não está uniformemente distribuída nas células, mas, sim, confinada aos cloroplastos. Este acondicionamento de clorofila resulta em sombreado entre as moléculas de clorofila e cria lacunas entre os cloroplastos, onde a luz não é absorvida — por isso, a referência a uma peneira. Devido ao efeito peneira, a absorção total de luz por uma certa quantidade de clorofila em uma célula paliçádica é menor do que a luz absorvida pela mesma quantidade de clorofila em uma solução.

A **canalização da luz** ocorre quando parte da luz incidente é propagada por meio do vacúolo central das células paliçádicas e pelos espaços de ar entre as células, uma disposição que facilita a transmissão de luz para o interior da folha (Vogelmann, 1993).

Abaixo das camadas paliçádicas localiza-se o **parênquima esponjoso,** onde as células têm formas irregulares e são delimitadas por amplos espaços de ar (ver Figura 9.4), geradores de muitas interfaces entre ar e água, que refletem e refratam a luz, o que torna aleatória a sua direção de movimento. Esse fenômeno é chamado de *difusão luminosa*.

A difusão luminosa é especialmente importante em folhas, pois as reflexões múltiplas entre as interfaces célula-ar aumentam muito o comprimento da trajetória sobre a qual o fóton se move, aumentando, assim, a probabilidade de absorção. Na realidade, os comprimentos das trajetórias de fótons dentro das células são comumente, no mínimo, quatro vezes mais longos do que a espessura da folha (Richter e Fukshansky, 1996). Então, as propriedades das células paliçádicas, que permitem a passagem direta da luz, e as propriedades das células do parênquima esponjoso, que servem à dispersão luminosa, determinam uma absorção luminosa mais uniforme através da folha.

Alguns ambientes, como os desertos, têm abundância de luz, o que é potencialmente prejudicial às folhas. Nesses ambientes, as folhas freqüentemente têm características anatômicas especiais, tais como tricomas, glândulas de sal e cera epicuticular, que aumentam a reflexão da luz pela superfície foliar, reduzindo, assim, a absorção luminosa (Ehleringer e cols., 1976). Tais adaptações podem reduzir a absorção da luz em 40%, minimizando o aquecimento e outros problemas associados à absorção de luz em demasia.

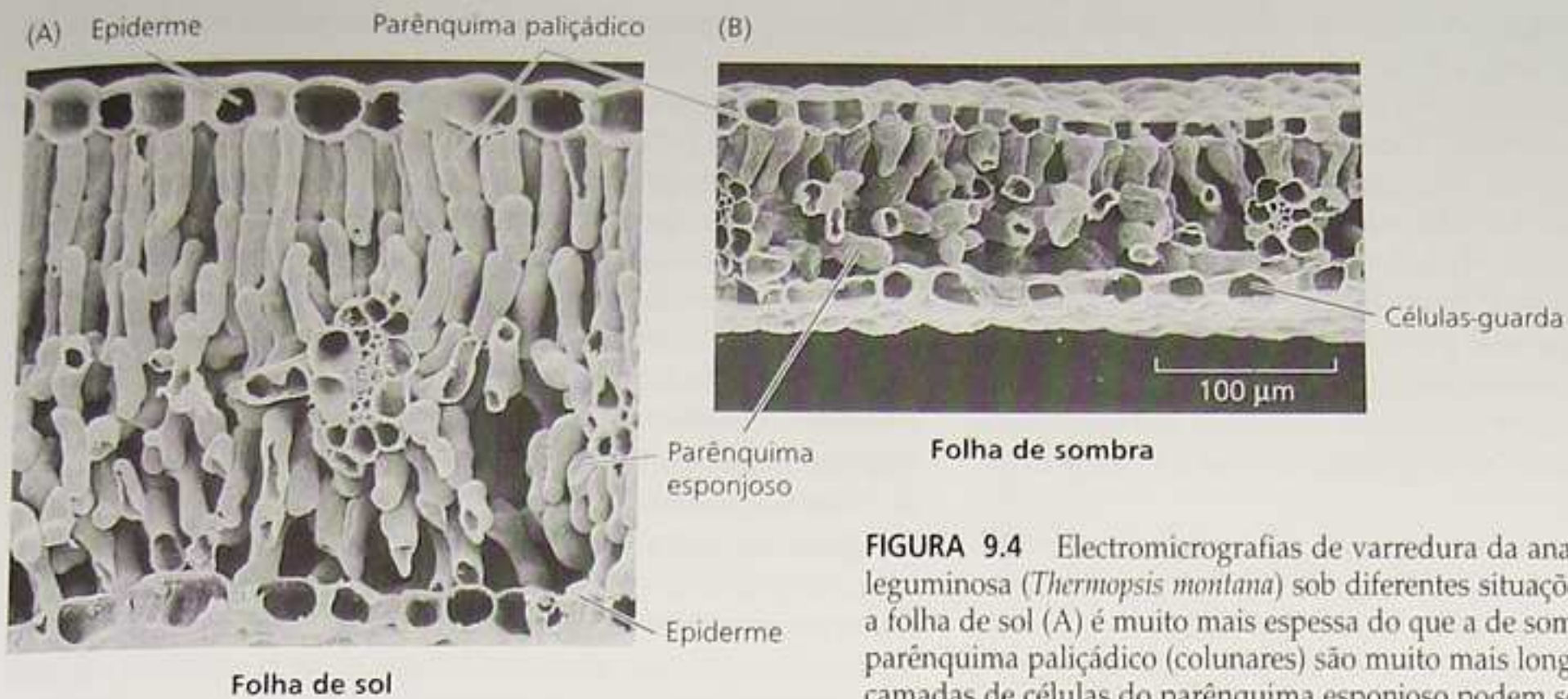



FIGURA 9.4 Electromicrografias de varredura da anatomia foliar de uma leguminosa (*Thermopsis montana*) sob diferentes situações luminosos. Observe que a folha de sol (A) é muito mais espessa do que a de sombra (B) e que as células do parênquima paliçádico (colunares) são muito mais longas na folha de sol. As camadas de células do parênquima esponjoso podem ser vistas abaixo do parênquima paliçádico (micrografias cedidas por T. Vogelmann).

Os movimentos dos cloroplastos e da folha podem controlar a interrupção de luz

O movimento de cloroplastos é bastante comum em algas, musgos e folhas de plantas superiores (Haupt e Scheuerlein, 1990). Se a orientação e a posição de cloroplastos forem controladas, as folhas podem regular qual a quantidade de luz incidente a ser absorvida. Sob luz fraca (Figura 9.5B), os cloroplastos acumulam-se nas superfícies celulares paralelamente ao plano da folha, de modo que ficam alinhados perpendicularmente à luz incidente — uma posição que maximiza a absorção de luz.

Sob luz forte (Figura 9.5C), os cloroplastos movem-se para as superfícies celulares paralelas à luz incidente, de modo a evitar a absorção em excesso. Tal reordenação dos cloroplastos pode aumentar a quantidade de luz absorvida pela folha em cerca de 15% (Gordon e cols., 1999). O movimento de cloroplastos em folhas é uma resposta típica à luz azul (veja Capítulo 18). A luz azul também controla a orientação dos cloroplastos em muitas plantas infe-

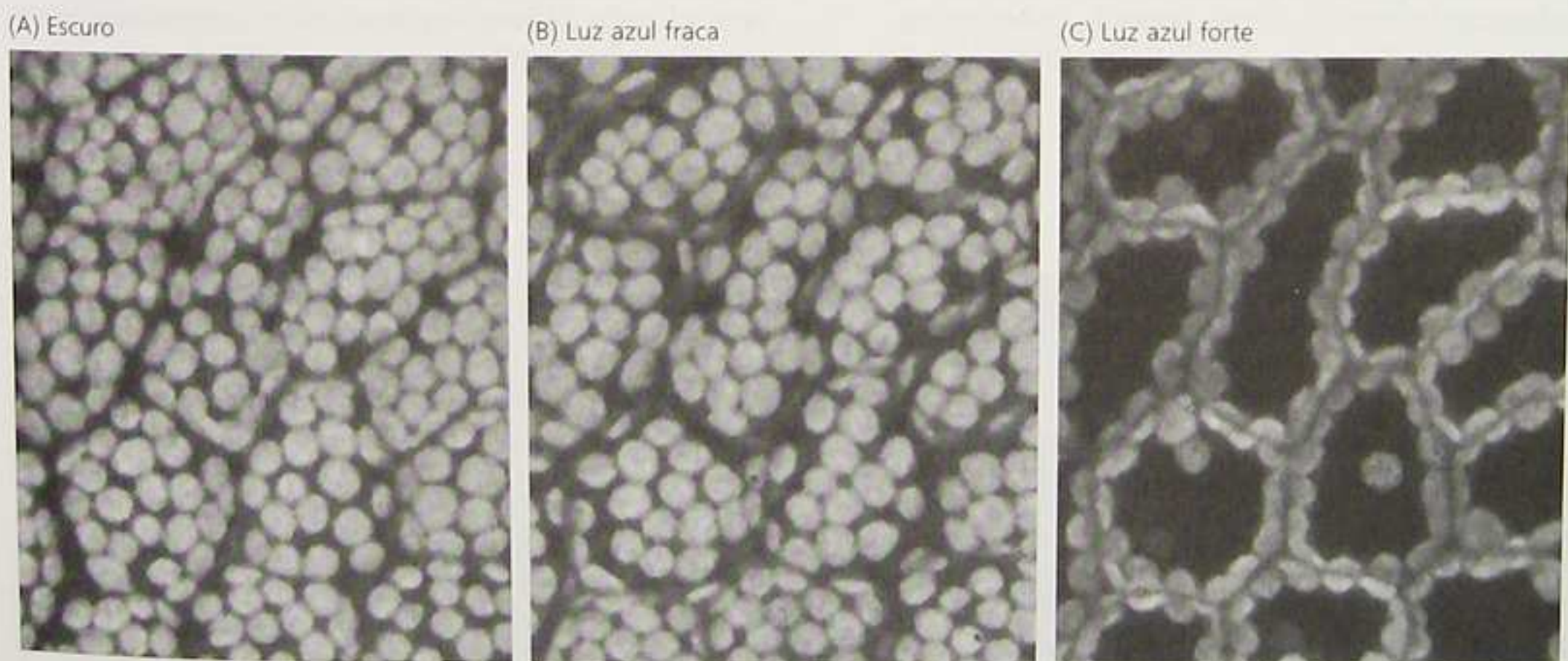



FIGURA 9.5 Distribuição de cloroplastos em células fotossintetizantes da lentilha-d'água (*Lemna*). Estas vistas frontais mostram as mesmas células sob três situações: (A) escuro, (B) luz azul fraca e (C) luz azul forte. Em A e B, os cloroplastos estão posicionados próximo à superfície superior das células, onde podem absorver quantidades máximas de luz. Quando as células foram irradiadas com luz azul forte (C), os cloroplastos moveram-se para as paredes laterais, reduzindo a exposição à luz e, assim, minimizando a sua absorção (micrografias cedidas por M. Tlalka e M. D. Fricker).

riores, mas em algumas algas o movimento dos cloroplastos é controlado por fitocromos (Haupt e Scheuerlein, 1990). Nas folhas, os cloroplastos movem-se ao longo de filamentos de actina no citoplasma e o cálcio regula este movimento (Tlalka e Fricker, 1999).

As folhas têm a absorção luminosa mais alta, quando a lâmina foliar dispõe-se perpendicularmente à luz incidente. Algumas plantas controlam a absorção da luz pela **trajetória solar** (Koller, 2000), ou seja, suas folhas ajustam continuamente a orientação das suas lâminas, de modo que elas permanecem perpendiculares aos raios solares (Figura 9.6). Alfafa, algodoeiro, soja, feijoeiro, lupino e algumas espécies selvagens da família *Malvaceae* são exemplos de plantas capazes de ajustar suas lâminas foliares à trajetória solar.

As folhas que se posicionam segundo a trajetória solar mantêm uma posição quase vertical ao nascer do sol, voltando-se para o leste, onde o sol irá nascer. As lâminas foliares seguem o movimento do sol, com uma exatidão de ±15°, até o crepúsculo, quando as lâminas tornam-se quase verticais, voltadas para o oeste, onde o sol se põe. Durante a noite, a folha assume uma posição horizontal e se reorienta para o leste, antecipando um novo nascer do sol. As folhas acompanham o movimento do sol somente em dias claros, comportamento que é interrompido quando uma nuvem obscurece o sol. No caso de uma cobertura intermitente de nuvens, algumas folhas podem alterar a sua posição em 90° por hora, podendo, assim, ajustar-se à nova posição solar, quando o sol emerge por trás de uma nuvem (Koller, 1990).

A sensação da luz azul em folhas ajustadas à trajetória solar ocorre em regiões especializadas. Em espécies de *Lavatera* (Malvaceae), a região fotossensível está localizada nas nervuras foliares maiores ou perto delas (Koller, 1990). Em lupinos (*Lupinus*, Fabaceae), as folhas consistem de cinco ou mais folíolos e a região fotossensível está localizada na parte basal de cada folíolo.

Em muitos casos, a orientação foliar é controlada por um órgão especializado chamado de **pulvino**, encontrado na junção da lâmina com o pecíolo, o qual contém células motoras que mudam seu potencial osmótico e geram forças mecânicas determinantes da orientação laminar. Em outras plantas, a orientação foliar é controlada por pequenas mudanças mecânicas ao longo do comprimento do pecíolo e por movimentos das partes mais jovens do caule.

Algumas plantas que ajustam sua posição de acordo com a trajetória do sol podem também mover suas folhas de modo a evitar a exposição total à luz solar, minimizando, assim, o aquecimento e a perda de água. Baseado no termo **heliotropismo** (voltado para o sol), que é freqüentemente empregado para descrever movimentos foliares induzidos pelo sol, essas folhas que evitam o sol são chamadas de *para-heliotrópicas* e as que maximizam a interceptação pelo ajuste à trajetória solar, denominam-se *dia-heliotrópicas*. Algumas espécies vegetais podem exibir movimentos dia-heliotrópicos, quando estão bem-hidratadas, e para-heliotrópicos, quando estão sob estresse hídrico.

Uma vez que a luz solar total excede a quantidade de luz que pode ser utilizada para a fotossíntese, que vantagem é obtida ao acompanhar a trajetória solar? Ao manter as folhas perpendiculares ao sol, as plantas ajustadas à trajetória solar apresentam taxas fotossintéticas máximas durante o dia, incluindo o começo da manhã e o final da tarde. Além disso, a temperatura do ar é menor durante o começo da manhã e no final da tarde, de modo que o estresse hídrico é menor. O ajuste à trajetória solar, por esse motivo, oferece uma vantagem às plantas que crescem em regiões áridas.

As plantas se adaptam ao sol e à sombra

Algumas plantas têm suficiente plasticidade de desenvolvimento para se adaptarem a uma amplitude de regimes de luz, crescendo como plantas de sol em áreas ensolaradas e como plantas de sombra em habitats sombrios. Alguns habitats sombrios recebem menos do que 1% da PAR disponível em ambiente exposto. As folhas adaptadas a ambientes bastante ensolarados ou bastante sombrios são muitas vezes incapazes de sobreviver em outro tipo de habitat (veja Figura 9.10). Folhas de sol e de sombra têm algumas características contrastantes:

- As *folhas de sombra* têm mais clorofila por centro de reação, a razão clorofila *b*/clorofila *a* é mais alta e são geralmente mais finas do que as folhas de sol.

(A)

(B)

FIGURA 9.6 Movimento foliar em plantas que se ajustam à posição do sol. (A) Orientação foliar inicial do lupino (*Lupinus succulentus*). (B) Orientação foliar quatro horas após exposição à luz oblíqua. A direção da fonte luminosa está indicada por setas. O movimento é gerado por tumefação assimétrica de um pulvino, encontrado na junção da lâmina com o pecíolo. Em condições naturais, as folhas acompanham a trajetória do sol no céu (Vogelmann e Björn, 1983, cedida por T. Vogelmann).

- As *folhas de sol* têm mais rubisco e um *pool* de componentes do ciclo da xantofila maior do que as folhas de sombra (veja Capítulo 7).

Características anatômicas contrastantes também podem ser encontradas em folhas da mesma planta expostas a regimes luminosos diferentes. A Figura 9.4 mostra algumas diferenças anatômicas entre uma folha crescendo ao sol e uma folha crescendo à sombra. As folhas de sol são mais espessas e têm células paliçádicas mais longas do que as de sombra. Mesmo partes distintas de uma folha mostram adaptações ao seu microambiente luminoso. As células na superfície superior da folha, expostas ao fluxo fotônico mais alto, caracterizam folhas crescendo à plena luz do sol; as células na superfície inferior têm características encontradas em folhas de sombra (Terashima, 1992).

Essas modificações morfológicas e bioquímicas estão associadas com funções específicas. A luz vermelho-distante é absorvida principalmente pelo PSI e, alterando a razão PSI/PSII ou mudando as antenas de captação de luz associadas com os fotossistemas, torna possível manter um melhor balanço do fluxo de energia por meio dos dois fotossistemas (Melis, 1996). Tais adaptações são encontradas na natureza; algumas plantas de sombra mostram uma razão 3:1 dos centros de reação do fotossistema II para o fotossistema I, em comparação com a razão 2:1 encontrada em plantas de sol (Anderson, 1986). Outras plantas de sombra, em vez de alterar a razão de PSI para PSII, adicionam mais clorofila de antenas ao PSII. Essas adaptações parecem acentuar a absorção de luz e a transferência de energia em ambientes sombrios, onde a luz vermelho-distante é mais abundante.

As plantas de sol e de sombra também diferem em suas taxas respiratórias, diferenças que alteram a relação entre respiração e fotossíntese, conforme será visto mais adiante neste capítulo.

FIGURA 9.7 A distribuição espectral da luz solar, no topo de um dossel e sob o dossel. Para a luz solar infiltrada, a irradiância total foi de 1.900 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$; para a sombra, foi de 17,7 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$. A maior parte da radiação fotossinteticamente ativa foi absorvida por folhas no dossel (Smith, 1994).

As plantas competem pela luz solar

As plantas normalmente competem pela luz solar. Mantidas verticalmente pelos caules, as folhas configuram um dossel que absorve luz e influencia taxas fotossintéticas e crescimento sob ele.

As folhas que estão sombreadas por outras folhas têm taxas fotossintéticas muito mais baixas. Algumas plantas têm folhas muito espessas que transmitem pouca ou nenhuma luz. Outras plantas, como o dente-de-leão (*Taraxacum sp.*), têm o hábito de crescimento em roseta, com as folhas crescendo radialmente muito próximas entre si e junto ao caule, impedindo, assim, o crescimento de outras folhas abaixo delas.

As árvores representam uma adaptação importante à intercepção da luz. A estrutura elaborada de ramificações de árvores aumenta bastante a intercepção de luz solar. Muito pouca PAR penetra no dossel de muitas florestas; ela é quase toda absorvida pelas folhas (Figura 9.7).

Outra característica do habitat sombrio são as **manchas de sol** provocadas pela luz solar que passa através de pequenas clareiras no dossel e alcança as folhas de sombra. Na floresta densa, as manchas de sol podem mudar o fluxo fotônico que atinge a folha no chão da floresta em mais de dez vezes por segundo. Para algumas dessas folhas, a mancha de sol contém aproximadamente 50% do total da energia luminosa disponível durante o dia, mas esta energia crítica está disponível em uma quantidade muito alta por apenas poucos minutos.

As manchas de sol também desempenham um papel no metabolismo do carbono de folhas inferiores nos densos conjuntos sombreados pelas folhas superiores da planta. As respostas rápidas do aparato fotossintético e dos estômatos às manchas de sol têm sido de substancial interesse para fisiologistas e ecólogos (Pearcy e cols., 1997), pois elas representam respostas fisiológicas únicas e especializadas para captação de uma pequena penetração de luz solar.

RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS À LUZ PELA FOLHA INTACTA

A luz é um recurso crítico para plantas, que pode freqüentemente limitar o crescimento e a reprodução. As propriedades fotossintéticas da folha fornecem valiosa informação sobre as adaptações da planta ao seu ambiente luminoso.

Nesta seção, serão descritas as respostas fotossintéticas típicas à luz, medidas por curvas de resposta à luz. Será considerado também como uma característica importante de curvas de resposta à luz, o ponto de compensação da luz, explica propriedades fisiológicas contrastantes de plantas de sol e de sombra. Após, serão vistos os rendimentos quânticos da fotossíntese na folha intacta e as diferenças em rendimentos quânticos entre plantas C_3 e C_4. A seção é encerrada com descrições de adaptações foliares ao excesso de luz e os diferentes caminhos de dissipação de calor na folha.

As curvas de resposta à luz revelam propriedades fotossintéticas

A medição da fixação de CO_2 em folhas intactas, sob um fluxo fotônico crescente, permite construir curvas de resposta à luz (Figura 9.8), que nos fornecem informação importante sobre as propriedades fotossintéticas de folhas. No escuro, não há assimilação fotossintética de carbono e o CO_2 é desprendido pela respiração da planta (ver Capítulo 11). Por convenção, a assimilação de CO_2 é negativa nesta parte da curva de resposta à luz. Como o fluxo fotônico aumenta, a assimilação fotossintética de CO_2 cresce até se igualar à liberação de CO_2 pela respiração mitocondrial. O **ponto de compensação da luz** é aquele em que há um exato equilíbrio entre absorção e liberação de CO_2.

O fluxo fotônico no qual folhas diferentes alcançam o ponto de compensação da luz varia conforme a espécie e com as condições de desenvolvimento. Uma das diferenças mais interessantes é encontrada entre plantas que crescem sob luz solar total e aquelas que crescem à sombra (Figura 9.9). Os pontos de compensação da luz de plantas de sol variam de 10 a 20 µmol m^{-2} s^{-1}; os valores correspondentes de plantas de sombra vão de 1 a 5 µmol m^{-2} s^{-1}.

Os valores para plantas de sombra são menores porque as suas taxas respiratórias são muito baixas, de modo que uma pequena fotossíntese líquida é suficiente para levar a zero as taxas líquidas de troca de CO_2. As baixas taxas respiratórias parecem representar uma adaptação básica que permite às plantas de sombra sobreviver em ambientes limitados pela luz.

Uma elevação do fluxo fotônico acima do ponto de compensação da luz provoca uma aumento proporcional da taxa fotossintética (ver Figura 9.8), produzindo uma relação linear entre fluxo fotônico e taxa fotossintética. Tal relação linear acontece porque a fotossíntese é *limitada pela luz* naqueles níveis de incidência luminosa; assim, mais luz estimula mais fotossíntese.

Nessa porção linear da curva, a inclinação da linha revela o **rendimento quântico máximo** de fotossíntese para a folha. Lembre-se de que o rendimento quântico é a relação entre um dado produto dependente de luz (neste caso, a assimilação de CO2) e o número de fótons absorvidos (ver Equação 7.5).

Os rendimentos quânticos variam de 0, onde nenhuma energia luminosa é usada na fotossíntese, a 1, onde toda a luz absorvida é usada. Lembre-se do Capítulo 7, no qual o rendimento quântico da fotoquímica é aproximadamente 0,95 e o rendimento quântico da evolução do oxigênio em cloroplastos isolados é de cerca de 0,1 (10 fótons por molécula de O_2.).

Em folha intacta, os rendimentos quânticos medidos para fixação do CO_2 variam de 0,04 a 0,06. Folhas sadias de muitas espécies de plantas C_3, mantidas sob baixas concentrações de O_2 que inibem a fotorrespiração, mostram, em geral, um rendimento quân-

Limitada pela luz
Limitada pelo CO_2
Ponto de compensação da luz (absorção de CO_2 = evolução de CO_2)
Taxa de respiração no escuro
Assimilação fotossintética de CO_2 (µmol m^{-2} s^{-1})
Luz absorvida (µmol m^{-2} s^{-1})

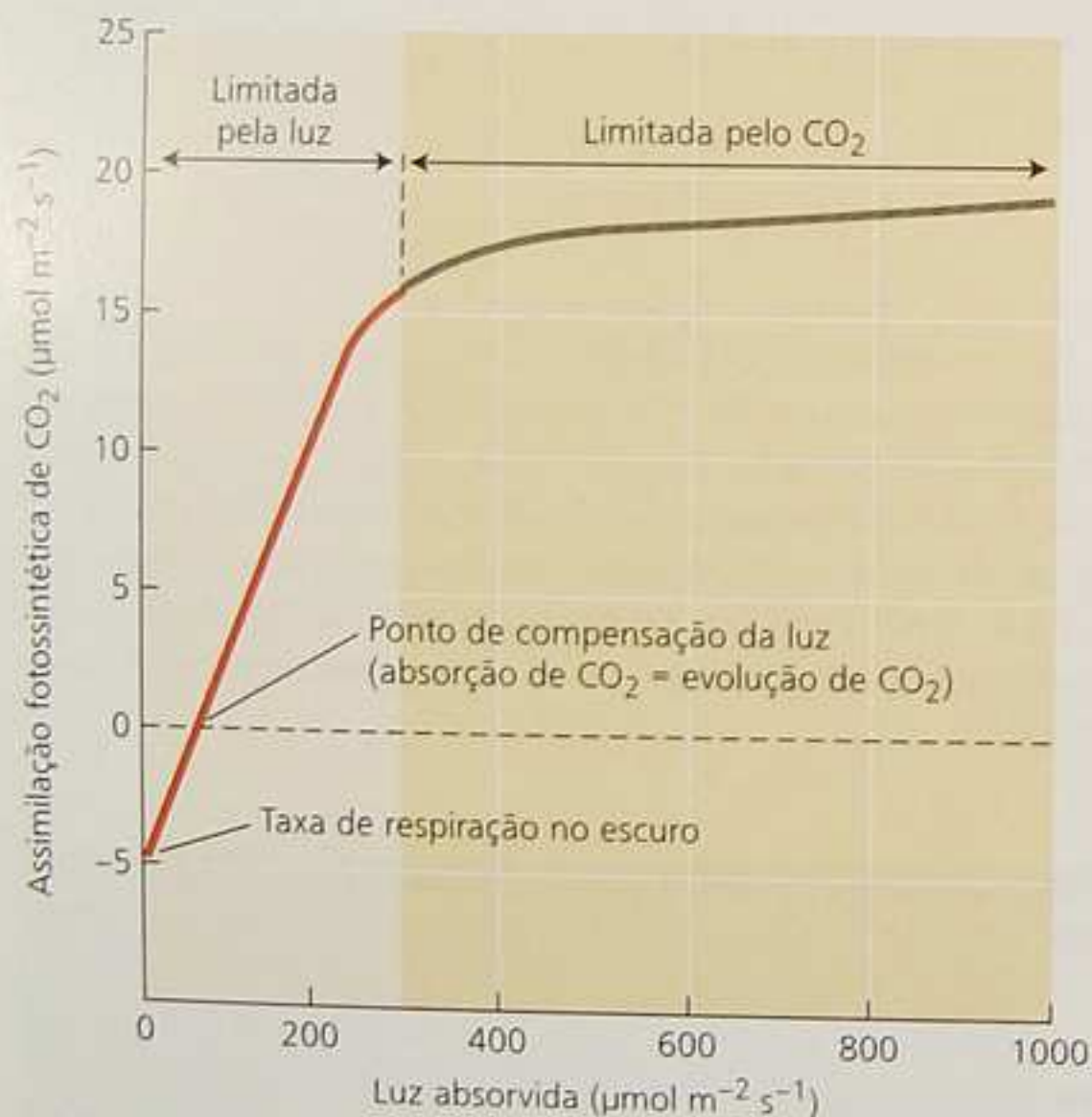



FIGURA 9.8 Resposta de fotossintética à luz, em uma planta C_3. No escuro, a respiração causa um efluxo líquido de CO_2 proveniente da planta. O ponto de compensação da luz é alcançado quando a assimilação fotossintética de CO_2 iguala-se à quantidade de CO_2 liberado pela respiração. Com o aumento da luz acima do ponto de compensação, a fotossíntese aumenta proporcionalmente, o que indica que a fotossíntese está limitada pela taxa de transporte de elétrons, a qual, por sua vez, está limitada pela quantidade de luz disponível. Essa porção da curva é referida como limitada pela luz. Os aumentos posteriores na fotossíntese são eventualmente limitados pela capacidade de carboxilação da rubisco ou pelo metabolismo das trioses fosfato. Essa parte da curva é referida como limitada pelo CO_2.

Atriplex triangularis (planta de sol)
Asarum caudatum (planta de sombra)
Assimilação fotossintética de CO_2 (µmol m^{-2} s^{-1})
Radiação fotossinteticamente ativa
Irradiância (µmol m^{-2} s^{-1})

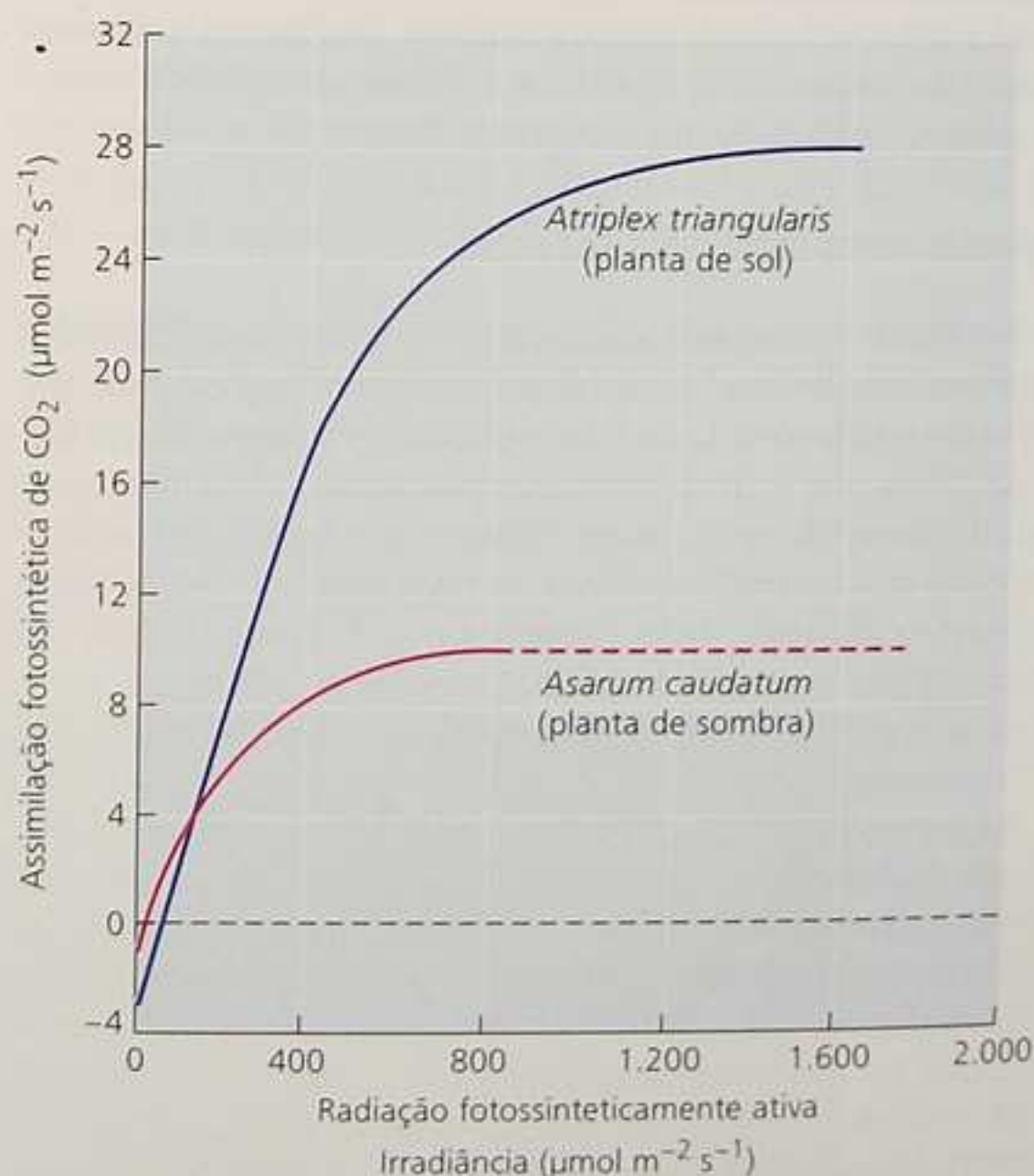



FIGURA 9.9 Curvas de resposta à luz da fixação fotossintética do carbono em plantas de sol e de sombra. *Atriplex triangularis* (armole triangular) é uma planta de sol, enquanto *Asarum caudatum* (gengibre silvestre) é de sombra. As plantas de sombra têm tipicamente um ponto de compensação da luz baixo e taxas fotossintéticas mais baixas, quando comparadas com plantas de sol. A linha tracejada foi extrapolada da parte medida da curva (Harvey, 1979).

tico de 0,1. No ar normal, o rendimento quântico de plantas C_3 é mais baixo, tipicamente 0,05.

O rendimento quântico varia com a temperatura e a concentração do CO_2, devido ao seu efeito sobre a razão das reações de carboxilase e oxigenase da rubisco (ver Capítulo 8). Abaixo de 30°C, os rendimentos quânticos de plantas C_3 são, em geral, mais altos do que os de plantas C_4; acima de 30°C, a situação é freqüentemente invertida (ver Figura 9.23). A despeito dos seus habitats de crescimento diferentes, plantas de sol e de sombra mostram rendimentos quânticos similares.

Em fluxos fotônicos mais altos, a resposta fotossintética começa a estabilizar-se (ver Figura 9.8) e alcança a *saturação*. Uma vez alcançado o ponto de saturação, aumentos posteriores no fluxo fotônico não afetam mais as taxas fotossintéticas, indicando que outros fatores que não a luz incidente, tais como a taxa de transporte de elétrons, atividade da rubisco ou o metabolismo de trioses fosfato tornam-se limitantes à fotossíntese.

Após o ponto de saturação, a fotossíntese é comumente referida como *limitada pelo* CO_2, refletindo a incapacidade das enzimas do ciclo de Calvin em acompanhar a energia luminosa absorvida. Os níveis de saturação da luz para plantas de sombra são substancialmente mais baixos do que os de plantas de sol (ver Figura 9.9). Esses níveis geralmente refletem o fluxo fotônico máximo ao qual a folha foi exposta durante o crescimento (Figura 9.10).

A curva de resposta à luz da maioria das folhas satura entre 500 e 1000 μmol m^{-2} s^{-1}, fluxos fotônicos bem abaixo da luz solar total (que é de cerca de 2000 μmol m^{-2} s^{-1}). Embora as folhas individuais raramente sejam capazes de utilizar toda a luz solar, no todo as plantas em geral consistem de muitas folhas que fazem sombra umas para outras. Por exemplo, apenas uma pequena fração das folhas de uma árvore está exposta à luz total do sol, a qualquer hora do dia. O resto das folhas recebe fluxos fotônicos subsaturantes, em forma de pequenas manchas de luz que passam através de clareiras no dossel ou sob forma de luz transmitida por outras folhas. Já que a resposta fotossintética da planta intacta é a soma da atividade fotossintética de todas as folhas, só raramente a fotossíntese é saturada em toda a planta.

As curvas de resposta à luz de árvores individuais e do dossel da floresta mostram que a taxa fotossintética aumenta com o fluxo de fótons e a fotossíntese geralmente não satura, mesmo sob luz solar total (Figura 9.11). Neste sentido, a produtividade da cultura está relacionada à quantidade total de luz recebida durante a estação de crescimento; com água e nutrientes suficientes, quanto mais luz a cultura receber, mais alta é a biomassa (Ort e Baker, 1988).

FIGURA 9.10 Resposta à luz da fotossíntese de uma planta de sol cultivada sob condições de sol ou sombra. A curva superior representa uma folha de *Atriplex triangularis* submetida a uma irradiância 10 vezes mais alta que a da curva inferior. Na folha cultivada em níveis luminosos mais baixos, a fotossíntese satura a uma irradiância substancialmente mais baixa, indicando que as propriedades fotossintéticas de uma folha dependem das suas condições de crescimento. A linha tracejada foi extrapolada da parte medida da curva (Björkman, 1981).

As folhas precisam dissipar o excesso de energia luminosa

Quando expostas ao excesso de luz, as folhas precisam dissipar o excedente de energia luminosa absorvido, de modo que ele não prejudique o aparato fotossintético (Figura 9.12). Existem várias rotas de dissipação de energia, envolvendo *quenching não-fotoquímico* (ver Capítulo 7), que é o *quenching* da fluorescência da clorofila por mecanismos que não os fotoquímicos. O exemplo mais importante envolve a transferência de energia luminosa, absorvida longe do transporte de elétrons, para a produção de calor. Embora os mecanismos moleculares não sejam ainda totalmente compreendidos, o ciclo da xantofila parece ser um caminho importante para dissipação do excesso de energia luminosa (ver **Ensaio 9.1 na Internet**).

O ciclo da xantofila. O Capítulo 7 abordou o ciclo da xantofila, que compreende os três carotenóides (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina) e está envolvido na dissipação do excesso de energia luminosa na folha (ver Figura 7.36). Sob alta luminosidade, a violaxantina é convertida em anteraxantina e depois em zeaxantina. Observe que cada um dos dois anéis aromáticos de violaxantina tem um átomo de oxigênio-limite, a anteraxantina tem um e a zeaxantina não tem nenhum (ver outra vez a Figura 7.36). Os experimentos têm mostrado que a zeaxantina é a mais efetiva das três xantofilas na dissipação do calor e a anteraxantina apresenta apenas a metade da efetividade. Enquanto os níveis de anteraxantina permanecem relativamente constantes durante o dia, o conteúdo de zeaxantina aumenta sob irradiâncias altas e diminui com irradiâncias baixas.

Em folhas que crescem sob luz solar plena, a zeaxantina e a anteraxantina podem constituir 60% do *pool* do ciclo da xantofila total, com níveis máximos de irradiância alcançados ao meio-dia (Figura 9.13). Em tais condições, uma quantidade substancial do excesso de energia luminosa absorvida pelos tilacóides pode ser dissipada como calor, evitando, assim, dano à estrutura fotossintética do cloroplasto (ver Capítulo 7). A fração de energia luminosa dissipada depende da irradiância, da espécie, das condições de cres-

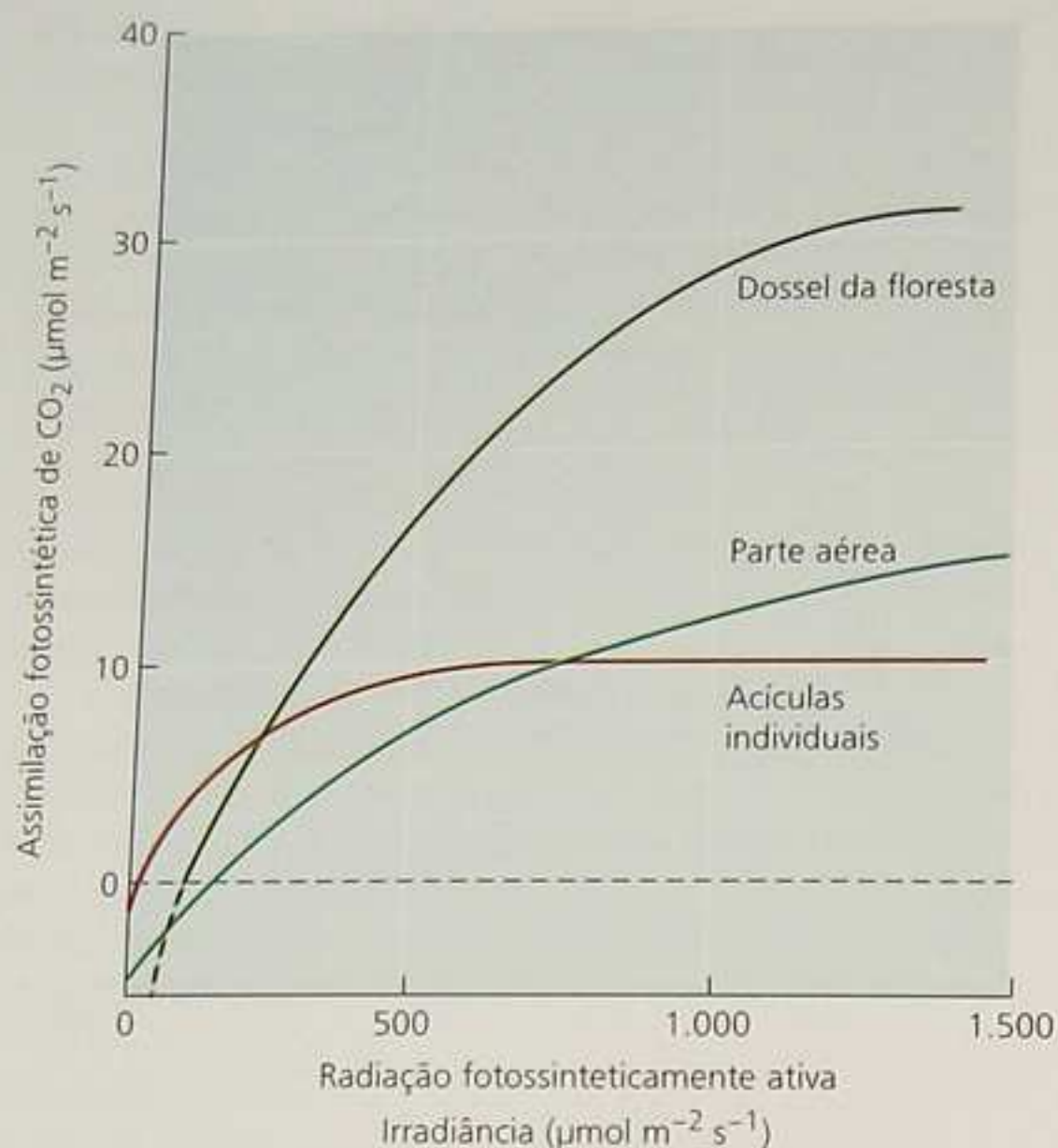



FIGURA 9.11 Mudanças na fotossíntese (expressas sobre uma base por metro quadrado) em acículas individuais, uma parte aérea complexa e um dossel de floresta de *Picea sitchensis*, em função da irradiância. As partes aéreas complexos consistem de agrupamentos de acículas que fazem sombra para outros, similar à situação em um dossel, onde os ramos freqüentemente sombreiam outros ramos. Como resultado do sombreamento, níveis de irradiância muito mais altos são necessários para saturar a fotossíntese. A linha tracejada foi extrapolada da parte medida da curva (Jarvis e Leverenz, 1983).

cimento, do *status* nutricional e da temperatura do ambiente (Demmig-Adams e Adams, 1996).

O ciclo da xantofila em folhas de sol e de sombra. As folhas que crescem sob luz solar plena contêm um *pool* de xantofila substancialmente maior do que as folhas de sombra, de modo que elas podem dissipar quantidades mais altas do excesso de energia luminosa. Todavia, o ciclo da xantofila também opera em plantas que crescem à sombra no interior da floresta, onde só ocasionalmente ficam expostas à luz solar que penetra através das clareiras do dossel. A exposição da folha a uma mancha de sol resulta na conversão de grande quantidade da violaxantina presente em zeaxantina. Ao contrário das folhas típicas, nas quais os níveis de violaxantina aumentam mesmo quando as irradiâncias caem, a zeaxantina formada em folhas de sombra do interior da floresta é retida e protege a folha contra a exposição a manchas de sol subseqüentes.

O ciclo da xantofila é também encontrado em espécies como as coníferas, cujas folhas permanecem verdes durante o inverno, quando as taxas fotossintéticas são muito baixas, ainda que a absorção da luz permaneça alta. Ao contrário do ciclo diurno do *pool* de xantofila observado no verão, os níveis de zeaxantina permanecem altos o dia inteiro durante o inverno. Presumivelmente, esse mecanismo maximiza a dissipação da energia luminosa, protegendo, assim, as folhas contra a fotoxidação durante o inverno (Adams e cols., 2001).

Além de proteger o sistema fotossintético contra a luz alta, o ciclo da xantofila pode auxiliar a proteger contra temperaturas altas. Os cloroplastos são mais tolerantes ao calor quando acumulam zeaxantina (Havaux e cols., 1996). Desse modo, as plantas podem empregar mais do que um mecanismo bioquímico para se precaverem contra o efeito deletério do excesso de calor.

As folhas necessitam dissipar vastas quantidades de calor

O calor acumulado sobre uma folha exposta à luz solar plena é muito alto. De fato, uma folha com uma espessura efetiva de água de 300 μm poderia aquecer até 100°C, se toda a energia solar fosse absorvida e não houvesse perda de calor. Contudo, esse significativo acúmulo de calor é dissipado pela emissão de radiação de ondas longas, pela perda de calor sensível (i. é, perceptível) e pela perda de calor evaporativo (ou latente) (Figura 9.14):

- A circulação do ar ao redor da folha remove o calor da superfície foliar, se a sua temperatura for mais alta que a do ar, fenômeno denominado **perda de calor sensível**.

FIGURA 9.12 Excesso de energia luminosa em relação a uma curva de resposta à luz de evolução fotossintética. A linha tracejada mostra a liberação teórica do oxigênio na ausência de qualquer limitação à fotossíntese. Em níveis de fluxo fotônico a partir de 150 μmol m^{-2} s^{-1}, uma planta de sombra está apta a utilizar a luz absorvida. No entanto, acima de 150 μmol m^{-2} s^{-1} a fotossíntese satura e uma quantidade cada vez maior de energia luminosa absorvida precisa ser dissipada. Sob irradiâncias mais altas, existe uma grande diferença entre a fração de luz usada pela fotossíntese *versus* aquela que deve ser dissipada (excesso de energia luminosa). As diferenças são muito maiores em uma planta de sombra do que em uma planta de sol (Osmond, 1994).

FIGURA 9.13 Mudanças diárias no teor de xantofilas em função da irradiância, no girassol (*Helianthus annuus*). Com o aumento da quantidade de luz incidente sobre a folha, uma proporção maior de violaxantina é convertida em anteraxantina e zeaxantina, dissipando, assim, o excesso de energia de excitação e protegendo o aparato fotossintético (Demmig-Adams e Adams, 1996).

ras foliares altas que normalmente acompanham a luminosidade alta? A síntese de isoprenos parece conferir estabilidade às membranas fotossintéticas, quando as folhas são submetidas a temperaturas e a luminosidade altas. Muitas plantas, incluindo o carvalho americano (*Quercus* sp.), o álamo (*Populus* sp.) e *Pueraria lobata* emitem moléculas gasosas de cinco carbonos, tal como o isopreno (2-metil-1,3-butadieno; ver Capítulo 13).

Em uma escala global, a quantidade dessas emissões liberadas para a atmosfera a cada ano chega a 5×10^{14} g. Tais hidrocarbonos gasosos são responsáveis pela fragrância de pinheiro (α-pineno e β-pineno) em florestas de coníferas e podem formar uma névoa azul sobre as florestas em dias quentes. Por desempenhar um papel importante na química atmosférica, o isopreno e os hidrocarbonos relacionados têm atraído muita atenção de cientistas que se ocupam de questões atmosféricas.

A emissão de isopreno pelas folhas pode constituir uma fração significativa do carbono assimilado na fotossíntese. Mais de 2% do carbono fixado pela fotossíntese em folhas de álamo e carvalho, a 30°C, é liberado como isopreno, por exemplo ((Sharkey, 1996). As folhas de sol sintetizam mais isopreno do que as de sombra, sendo a síntese proporcional à temperatura da folha e ao estresse hídrico.

A evidência que o isopreno confere estabilidade às membranas fotossintéticas sob temperaturas altas provém de três tipos de resultados experimentais:

1. Enquanto a não-emissão de isopreno com um inibidor aumenta a suscetibilidade ao dano pelo calor, a adição de isopreno

- A **perda de calor evaporativo** ocorre porque a evaporação da água requer energia. Desse modo, como a água evapora da folha, ela retira calor dela e a refresca. O corpo humano é refrescado pelo mesmo princípio, pela transpiração.

A perda de calor sensível e a de calor evaporativo são os mais importantes processos na regulação da temperatura foliar e a razão das duas é denominada **razão de Bowen** (Campbell, 1977):

$$\text{Razão de Bowen} = \frac{\text{perda de calor sensível,}}{\text{perda de calor evaporativo}}$$

Em cultivos bem irrigados, a evaporação de água da folha é alta, de modo que a razão de Bowen é baixa (ver **Tópico 9.2 na Internet**). Por outro lado, quando o esfriamento evaporativo é limitado, a razão de Bowen é grande. Em alguns cactos, por exemplo, o fechamento estomático evita o esfriamento evaporativo; todo o calor é dissipado por perda de calor sensível e a razão de Bowen é infinita.

As plantas com razões de Bowen muito altas conservam água, mas têm que resistir temperaturas foliares também muito altas, a fim de manter um gradiente térmico suficiente entre a folha e o ar. O crescimento lento está em geral correlacionado com tais adaptações.

A síntese de isoprenos auxilia as folhas a suportar o calor

Viu-se como o ciclo da xantofila pode proteger contra a luminosidade alta, mas como os cloroplastos suportam as temperatu-

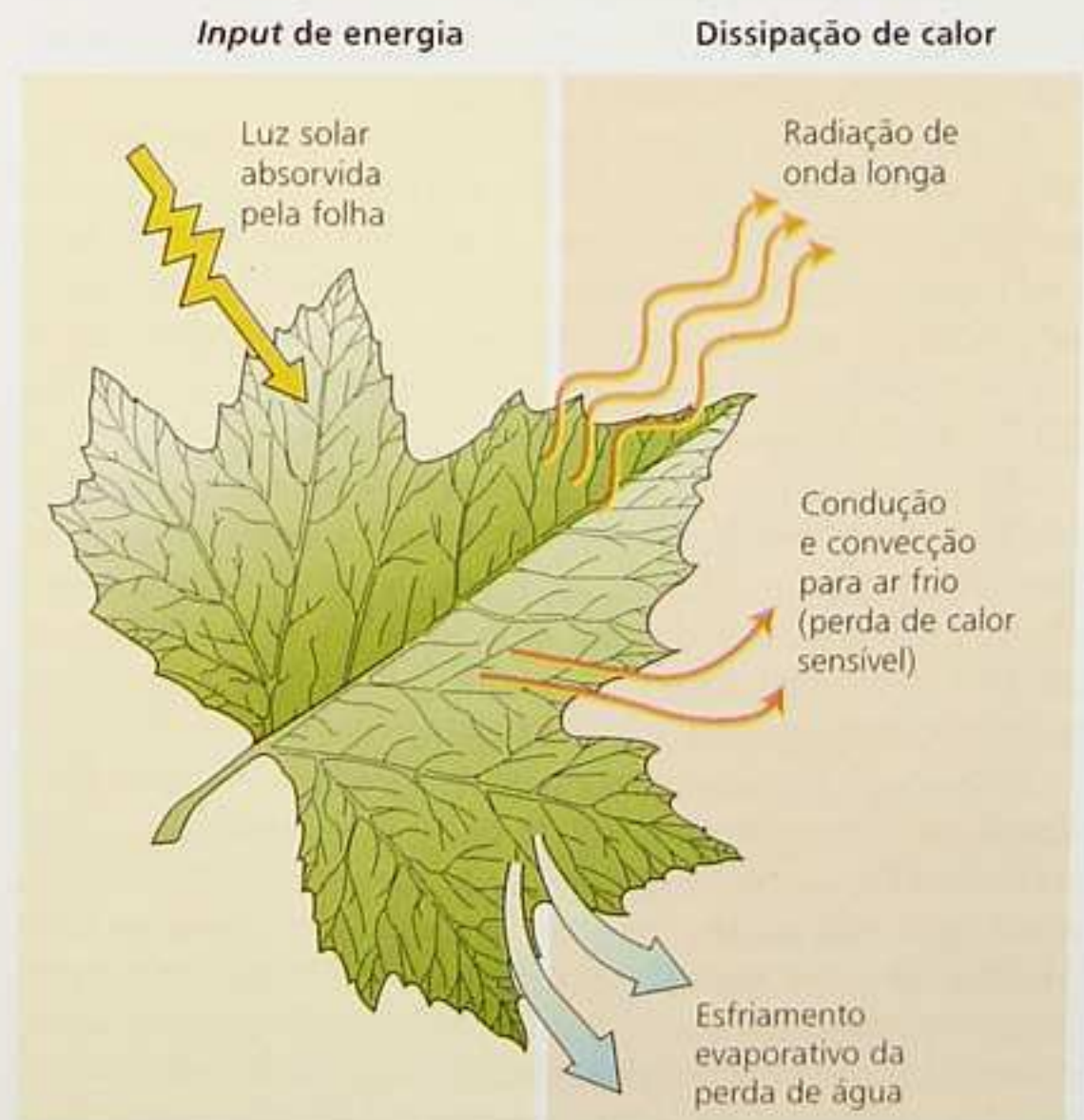



FIGURA 9.14 Absorção e dissipação de energia da luz solar pela folha. A carga de calor imposta deve ser dissipada, a fim de evitar dano à folha. A carga de calor é dissipada pela emissão de radiação de ondas longas, pela perda de calor sensível para o ar que circunda a folha e pelo esfriamento evaporativo causado pela transpiração.

às plantas que não o produzem estabiliza o calor (Sharkey e cols., 2001).

2. Os mutantes de plantas incapazes de emitir isopreno são mais facilmente danificados por temperaturas altas do que plantas do tipo selvagem (Sharkey e Singsaas, 1995).
3. O isopreno é rapidamente sintetizado enzimaticamente em resposta a temperaturas foliares elevadas.

A absorção de luz em demasia pode levar à foto-inibição

No Capítulo 7, viu-se que quando as folhas são expostas a uma quantidade de luz maior do que podem utilizar (ver Figura 9.12), o centro de reação do PSII é inativado e danificado, constituindo um fenômeno denominado **fotoinibição.** As características da fotoinibição na folha intacta dependem da quantidade de luz à qual a planta está exposta (Figura 9.15). Dois tipos de fotoinibição são identificados: fotoinibição dinâmica e crônica (Osmond, 1994).

Sob excesso de luz moderado, observa-se a **fotoinibição dinâmica.** A eficiência quântica decresce (compare as inclinações da curvas da Figura 9.15), mas a taxa fotossintética máxima permanece inalterada. A fotoinibição dinâmica é causada pelo desvio da energia luminosa absorvida em direção à dissipação do calor — por isso, o decréscimo em eficiência quântica. Tal decréscimo é freqüentemente temporário e a eficiência quântica pode retornar ao seu valor inicial mais alto, quando o fluxo fotônico decresce abaixo dos níveis de saturação.

A **fotoinibição crônica** resulta da exposição a níveis altos de excesso de luz, que danificam o sistema fotossintético e diminuem a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima (ver Figura 9.15). A fotoinibição crônica está associada ao dano e à substituição da proteína D1 do centro de reação PSII (ver Capítulo 7). Ao contrário da fotoinibição dinâmica, tais efeitos têm duração relativamente longa, persistindo por semanas ou meses.

As primeiras pesquisas sobre fotoinibição interpretavam todos os decréscimos de eficiência quântica como dano ao aparato fotossintético. Agora, reconhece-se que o decréscimo de curto prazo em eficiência quântica paracem refletir mecanismos protetores (ver Capítulo 7), enquanto que a fotoinibição crônica representa o dano presente ao cloroplasto, resultante de luz excessiva ou de falha dos mecanismos protetores.

Qual o significado da fotoinibição na natureza? A fotoinibição dinâmica parece ocorrer normalmente ao meio-dia, quando as folhas estão expostas a quantidades máximas de luz e existe uma redução correspondente de fixação de carbono. A fotoinibição é mais pronunciada em baixas temperaturas e torna-se crônica sob condições climáticas mais extremas.

Estudos de populações naturais do salgueiro, de culturas de colza (*Brassica napus*) e milho (*Zea mays*) têm mostrado que os efeitos cumulativos de uma depressão diária de taxas fotossintéticas, causada por fotoinibição, diminuem em 10% a biomassa ao final da estação de crescimento (Long e cols., 1994). Isso pode não parecer um efeito particularmente grande, mas pode também ser significativo em populações vegetais naturais competindo por recursos limitados — situações nas quais qualquer redução de carbono alocado para a reprodução pode ter efeito adverso no sucesso reprodutivo e na sobrevivência.

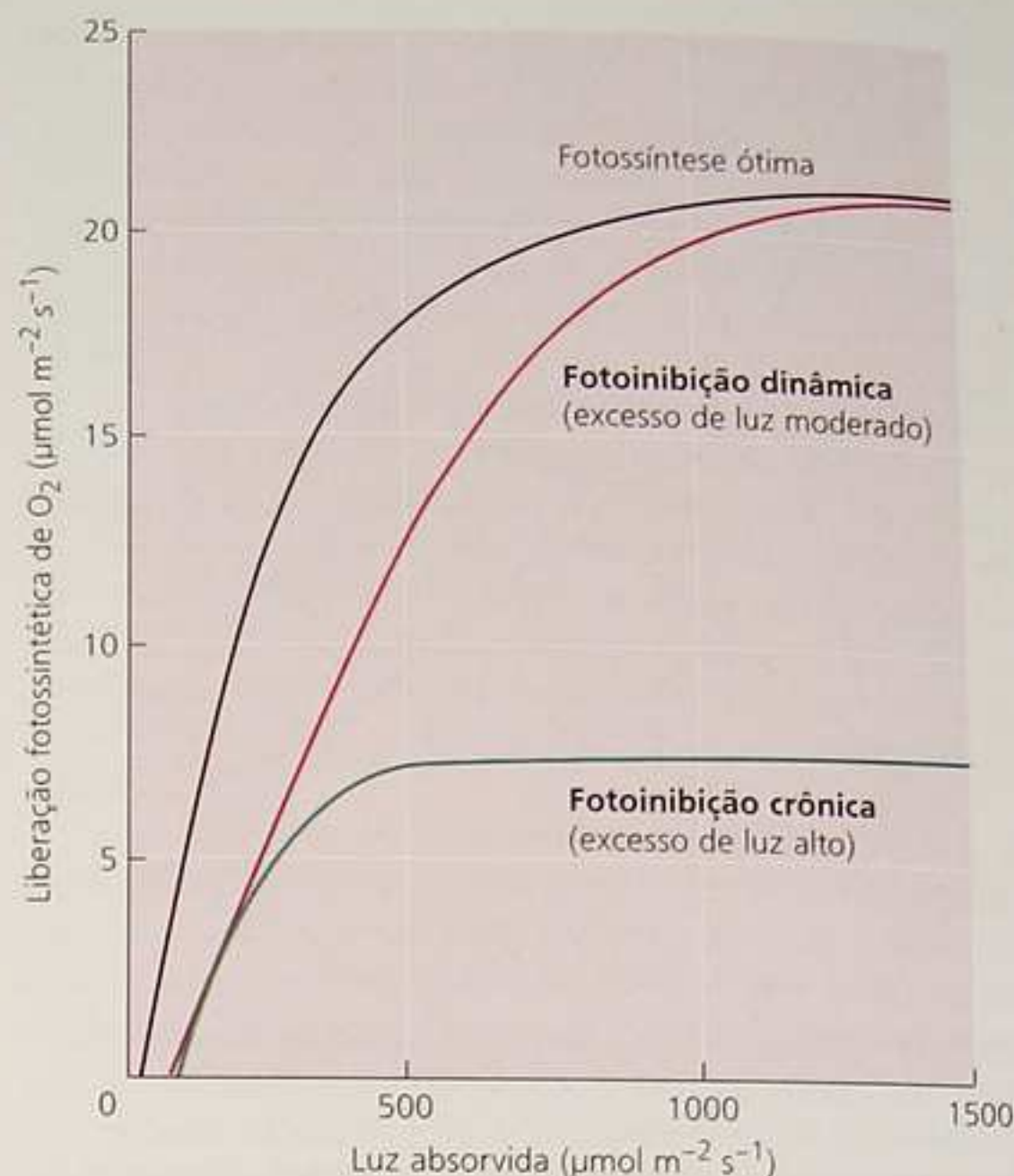



FIGURA 9.15 Mudanças nas curvas de fotossíntese em resposta à luz, causadas pela fotoinibição. A exposição a níveis moderados de excesso de luz pode diminuir a eficiência quântica (inclinação reduzida da curva), sem redução da taxa fotossintética máxima, condição denominada fotoinibição dinâmica. A exposição a níveis altos de excesso de luz leva à fotoinibição crônica, na qual o dano ao cloroplasto decresce a eficiência quântica e a taxa fotossintética máxima (Osmond, 1994).

RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS AO DIÓXIDO DE CARBONO

Viu-se como o crescimento vegetal e a anatomia foliar estão influenciados pela luz. Agora, a atenção será dirigida para saber como a concentração de CO_2 afeta a fotossíntese. O CO_2 difunde-se da atmosfera para as folhas: primeiramente, por meio dos estômatos, depois, através dos espaços intercelulares e, finalmente, para as células e os cloroplastos. Na presença de quantidades adequadas de luz, concentrações mais altas de CO_2 sustentam taxas fotossintéticas maiores. O inverso também é verdadeiro, ou seja, a concentração baixa de CO_2 pode limitar a taxa fotossintética.

Nesta secção, discutir-se-á a concentração do CO_2 atmosférico na história recente e sua disponibilidade para os processos de fixação do carbono. Após, serão consideradas as limitações que o CO_2 impõe à fotossíntese e o impacto dos mecanismos concentradores de CO_2 de plantas C_4.

A concentração de CO_2 atmosférico continua subindo

O dióxido de carbono é um gás-traço na atmosfera, sendo presentemente responsável por cerca de 0,037% ou 370 partes por mi-

lhão (ppm) do ar. A pressão parcial de CO_2 do ambiente (C_a) varia com a pressão atmosférica e é de aproximadamente 36 pascais (Pa) no nível do mar (ver **Tópico 9.3 na Internet**). Em geral, o vapor de água fica acima 2% da atmosfera e O_2 responde por aproximadamente 20%. O componente em maior quantidade na atmosfera é o nitrogênio, com cerca de 80%.

A atual concentração de CO_2 atmosférico é quase o dobro da que prevalecia durante a maior parte dos últimos 160.000 anos, conforme medições de bolhas de ar apreendidas no gelo glacial da Antártica (Figura 9.16A). Exceto para os últimos 200 anos, as concentrações de CO_2 durante o passado geológico recente têm sido baixas, flutuando entre 180 e 260 ppm. Tais concentrações baixas eram típicas de tempos que retrocedem ao cretáceo, quando a Terra era muito mais quente e a concentração de CO_2 pode ter sido de 1.200 a 2.800 ppm (Ehleringer e cols., 1991).

A concentração atual do CO_2 da atmosfera está aumentando mais ou menos 1 ppm por ano, principalmente por causa da queima de combustíveis fósseis (ver Figura 9.16C). Desde 1958, quando começaram as medições sistemáticas de CO_2 em Mauna Loa, Havaí, as concentrações têm aumentado em mais do que 17% (Keeling e cols., 1995) e, em 2020, podem alcançar 600 ppm.

O efeito estufa. As conseqüências do aumento do CO_2 atmosférico estão na mira de cientistas e agências governamentais por causa das predições que o **efeito estufa** está alterando o clima do mundo. A expressão *efeito estufa* refere-se ao aquecimento do clima da Terra, que é causado pela captação de radiação de ondas longas pela atmosfera.

O teto de uma estufa transmite luz visível, que é absorvida por plantas e outras superfícies no seu interior. A energia luminosa absorvida é convertida em calor, e parte deste é reemitida como radiação de ondas longas. Como o vidro transmite muito pouca radiação de ondas longas, esta radiação não pode sair da estufa pelo teto de vidro. Com isso, a estufa esquenta.

Certos gases na atmosfera, em particular CO_2 e metano, desempenham o mesmo papel do teto de vidro na estufa. O aumento da concentração de CO_2 e da temperatura associada com o efeito estufa podem influenciar a fotossíntese. Nas concentrações de CO_2 atmosférico atuais, a fotossíntese de plantas C_3 está limitada (conforme se discutirá mais adiante neste capítulo), mas tal situação poderia mudar se a concentração do CO_2 atmosférico continuasse a crescer. Em condições de laboratório, a maioria das plantas C3 cresce 30 a 60% mais rápido quando a concentração de CO_2 é duplicada (para 600 a 700 ppm) e a taxa de crescimento altera-se de acordo como o estado nutricional (Bowes, 1993). Em algumas plantas, o aumento do crescimento é apenas temporário.

Para muitas plantas cultivadas, como de tomate, alface, pepino e rosas, crescendo em estufas sob condições nutricionais ótimas, o enriquecimento de dióxido de carbono neste ambiente determina um aumento da produtividade. O desempenho de plan-

(A)

Concentração de CO_2 (ppm)

Tempo decorrido (anos)

(B)

Ano

(C)

Ano

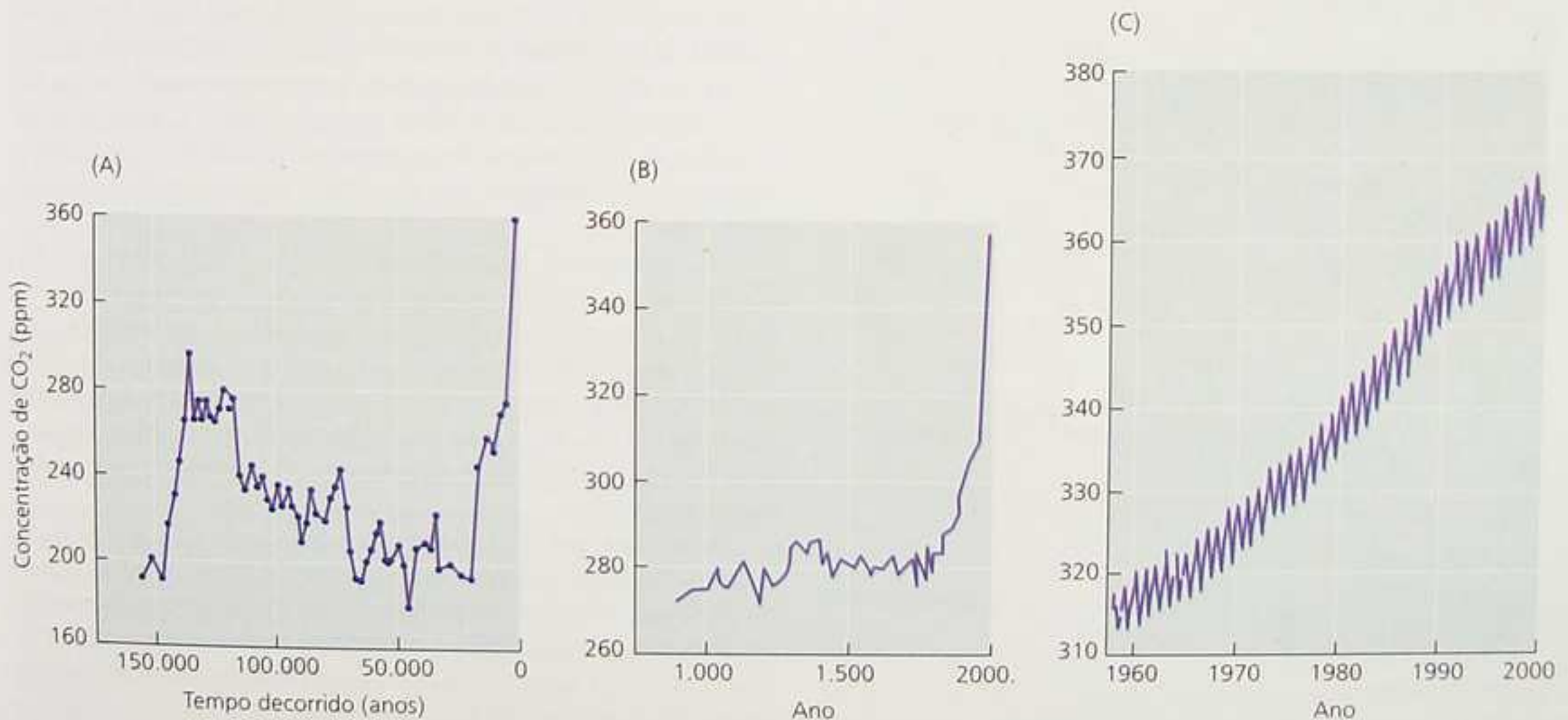



FIGURA 9.16 Concentração do CO_2 atmosférico, desde 160.000 anos passados até o presente. (A) As concentrações do CO_2 atmosférico no passado, determinadas a partir de bolhas apreendidas no gelo glacial da Antártica, eram muito mais baixas do que os níveis atuais. (B) Nos últimos 1.000 anos, a elevação da concentração de CO_2 coincide com a revolução industrial e com o aumento da queima de combustíveis fósseis. (C) As concentrações atuais do CO_2 atmosférico, medidas em Mauna Loa, Havaí, continuam a aumentar. A natureza ondulada do traço é causada pela mudança nas concentrações do CO_2 atmosférico associada ao crescimento das culturas agrícolas. A cada ano, a concentração mais alta de CO_2 é observada em maio, justamente antes do estação de crescimento no hemisfério Norte, e a concentração mais baixa é observada em outubro (Barnola e cols., 1994, Keeling e Whorf, 1994, Neftel e cols., 1994 e Keeling e cols., 1995).

tas C_3 com aumento do CO_2 é elevado porque a fotorrespiração decresce (ver Capítulo 8).

A difusão de CO_2 até o cloroplasto é essencial para a fotossíntese

Para a ocorrência da fotossíntese, o dióxido de carbono precisa se difundir da atmosfera para a folha e para o sítio de carboxilase da rubisco. Como as taxas de difusão dependem de gradientes de concentração (ver Capítulos 3 e 6), gradientes apropriados são necessários para garantir difusão de CO_2 adequada da superfície foliar até o cloroplasto.

A cutícula que cobre a folha é quase impermeável ao CO_2, de modo que a principal via de ingresso dele na folha são os estômatos. O CO_2 difunde-se para a câmara subestomática e para os espaços de ar entre as células do mesofilo. Esta parte do caminho de difusão do CO_2 para o cloroplasto é uma fase gasosa. O restante do caminho de difusão para o cloroplasto é uma fase líquida, a qual inicia na camada de água que umedece as paredes das células do mesofilo e continua pela membrana plasmática, pelo citosol e pelo cloroplasto (para examinar as propriedades do CO_2 em solução, ver **Tópico 8.3 na Internet**).

Cada trecho desta rota de difusão impõe uma resistência à difusão do CO_2, de modo que o suprimento de CO_2 para a fotossíntese encontra uma série de pontos de resistência (Figura 9.17). A avaliação da magnitude de cada ponto de resistência é de grande valor para a compreensão das limitações do CO_2 para a fotossíntese.

Resistência da fase líquida
Resistência do ar no espaço intercelular
Estômato
Poro estomático
Resistência estomática
Camada limítrofe
Resistência da camada limítrofe
CO_2

FIGURA 9.17 Pontos de resistência à difusão do CO_2 do exterior da folha para os cloroplastos. O poro estomático é o ponto de maior resistência à difusão do CO_2.*

O dióxido de carbono penetra nos espaços intercelulares da folha através dos poros estomáticos. A partir dos espaços de ar, ele se dissolve na água de paredes celulares úmidas e se difunde para a célula e o cloroplasto. O mesmo caminho é percorrido pela H_2O no sentido inverso.

O compartilhar desse caminho pelo CO_2 e pela água submete a planta a um dilema funcional. No ar com umidade relativa alta, o gradiente de difusão que move a perda de água é aproximadamente 50 vezes maior do que o gradiente que aciona a absorção de CO_2. No ar seco, esse gradiente pode ser ainda maior. Por conseqüência, um decréscimo na resistência estomática, pela abertura de estômatos, facilita a maior absorção de CO_2, mas a mesma é inevitavelmente acompanhada por substancial perda de água.

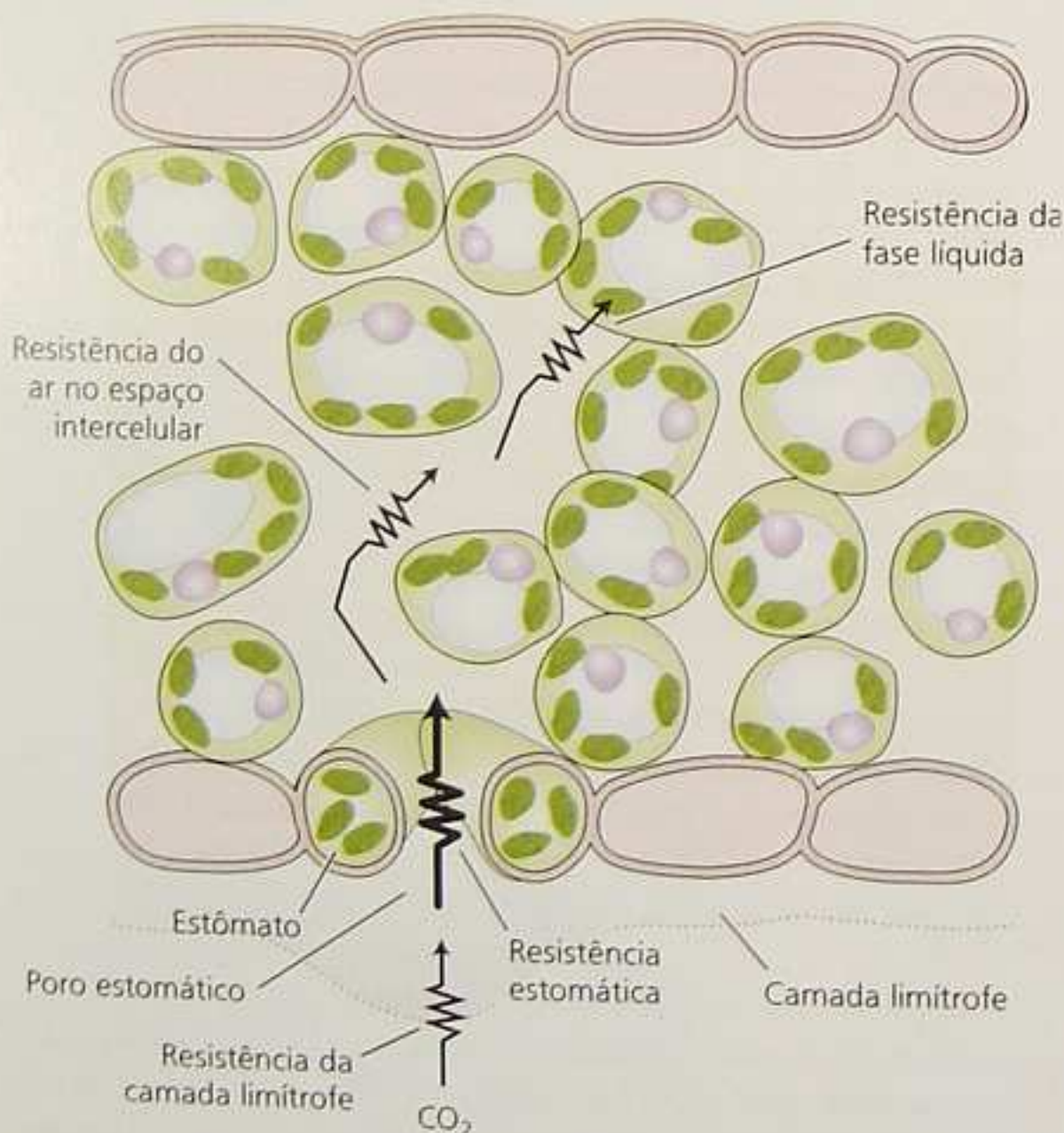
Lembre-se do Capítulo 4, no qual a fase gasosa da difusão do CO_2 para a folha pode ser dividida em três componentes — a camada-limite, o estômato e os espaços intercelulares da folha — cada uma impondo uma resistência à difusão do CO_2 (ver Figura 9.17).

A camada limítrofe consiste de ar relativamente parado junto à superfície foliar e sua resistência à difusão é denominada **resistência da camada limítrofe.** A magnitude da resistência da camada limítrofe decresce com o tamanho da folha e a velocidade do vento. Sua resistência à difusão da água e do CO_2 fisicamente relacionada à resistência que apresenta com relação à perda de calor sensível foi discutida anteriormente.

As folhas menores têm uma menor resistência da camada limítrofe à difusão do CO_2 e da água, e à perda de calor sensível. As folhas de plantas de deserto são geralmente pequenas, facilitando a perda de calor sensível. As folhas grandes, seguidamente encontradas nos trópicos úmidos, podem ter grandes resistências da camada limítrofe, mas essas folhas podem dissipar a carga do calor da radiação por esfriamento evaporativo, devido às taxas transpiratórias altas propiciadas pelo abundante suprimento de água nesses habitats.

Após a difusão pela camada limítrofe, o CO_2 penetra na folha via poros estomáticos, que impõem o próximo tipo de resistência no caminho da difusão, a **resistência estomática**. Na maioria das condições naturais, em que o ar ao redor da folha raras vezes está completamente parado, a resistência da camada limítrofe é muito menor do que a resistência estomática. Portanto, a principal limitação à difusão do CO_2 é imposta pela resistência estomática.

Existe também uma resistência à difusão do CO_2 nos espaços de ar que separam a câmara subestomática das paredes das células do mesofilo, denominada **resistência do ar no espaço intercelular**. Esta resistência também é geralmente pequena, causando uma queda de 0,5 Pa ou menos na pressão parcial do CO_2, comparada com os 36 Pa externamente à folha.

A resistência à difusão do CO_2 da fase líquida — a **resistência da fase líquida**, também de chamada de **resistência do mesofilo** — abrange a difusão dos espaços intercelulares da folha para os sítios de carboxilação no cloroplasto. Este ponto de resistência à difusão do CO_2 tem sido calculado como aproximadamente um décimo da resistência da camada limítrofe combinada com a resistência estomática, quando os estômatos estão totalmente abertos. Este baixo valor de resistência pode ser atribuído, em parte, à ampla superfície de células do mesofilo expostas aos

*N. de T. Segundo a terminologia adotada em língua portuguesa, a maior resistência à difusão ocorre no *ostíolo*, onde se estabelece o controle de abertura e fechamento do estômato. O poro representa o contato do átrio externo com o ar atmosférico e pode ter sua forma modificada, em função das variações de turgor das células-guarda.

espaços de ar intercelulares, que podem representar de 10 a 30 vezes a superfície foliar (Syvertsen e cols., 1995). Além disso, a localização de cloroplastos perto da periferia da célula minimiza a distância de difusão do CO_2 para os sítios de carboxilação dentro do cloroplasto.

A posição dos cloroplastos e a percentagem relativamente grande de espaços intercelulares (cerca de 20 a 40%) são características anatômicas especiais que facilitam a difusão interna e a absorção de CO_2 pelas folhas (Evans, 1999). Uma vez que os ostíolos em geral impõem a maior resistência à absorção do CO_2 e à perda de água no caminho da difusão, esta regulação proporciona à planta uma modo efetivo de controlar as trocas gasosas entre a folha e a atmosfera. Em medições experimentais de trocas gasosas de folhas, a resistência da camada limítrofe e a resistência do espaço intercelular geralmente são ignoradas, sendo a resistência estomática o único parâmetro utilizado para descrever a resistência da fase gasosa ao CO_2 (veja **Tópico 9.4 na Internet**).

Os padrões de absorção de luz geram gradientes de fixação de CO_2 dentro da folha

Discutiu-se como a anatomia foliar está especializada para captar a luz e como ela também facilita a difusão interna de CO_2, mas onde ocorrem as taxas máximas de fotossíntese na folha? Na maioria delas, a luz é absorvida preferencialmente na superfície superior, enquanto que o CO_2 penetra pela superfície inferior. Supondo que a luz e o CO_2 entrem por lados opostos da folha, a fotossíntese ocorre uniformemente nos tecidos foliares ou existe um gradiente fotossintético na folha? As propriedades fotossintéticas de uma folha estão determinadas por:

- perfis de absorção de luz através do mesofilo,
- capacidade fotossintética destes tecidos e
- suprimento interno de CO_2.

Para a maioria das folhas, a difusão interna de CO_2 é rápida. Assim, as limitações ao desempenho fotossintético no interior da folha são impostas por fatores distintos do suprimento de CO_2. Quando a luz branca penetra na superfície superior de uma folha, os fótons azul e vermelho são absorvidos preferencialmente por cloroplastos próximos à superfície irradiada (Figura 9.18), devido às fortes bandas de absorção de clorofila nas faixas do azul e do vermelho do espectro (ver Figura 7.5). A luz verde, por outro lado, penetra mais profundamente na folha. Comparando com o azul e o vermelho, a clorofila absorve muito pouco na faixa do verde (novamente, ver Figura 7.5); não obstante, a luz verde é muito efetiva no suprimento de energia para a fotossíntese em tecidos foliares exauridos de fótons azul e vermelho.

A capacidade do tecido foliar para assimilação fotossintética de CO_2 depende em grande parte do seu conteúdo de rubisco. No espinafre e na fava (*Vicia faba*), o conteúdo de rubisco começa baixo no ápice da folha, aumenta na região mediana e diminui outra vez na base. Como conseqüência, a distribuição de fixação de carbono dentro da folha tem a forma de sino (Figura 9.19). No espinafre, o parênquima esponjoso (ver Figura 9.4) fixa cerca de 40% do total de carbono. O significado funcional da distribuição de rubisco e dos perfis de assimilação de carbono dentro das folhas não está ainda conhecido, embora exista a probabilidade de variação dos perfis fotossintéticos em folhas com anatomia diferente e em folhas adaptadas a ambientes distintos.

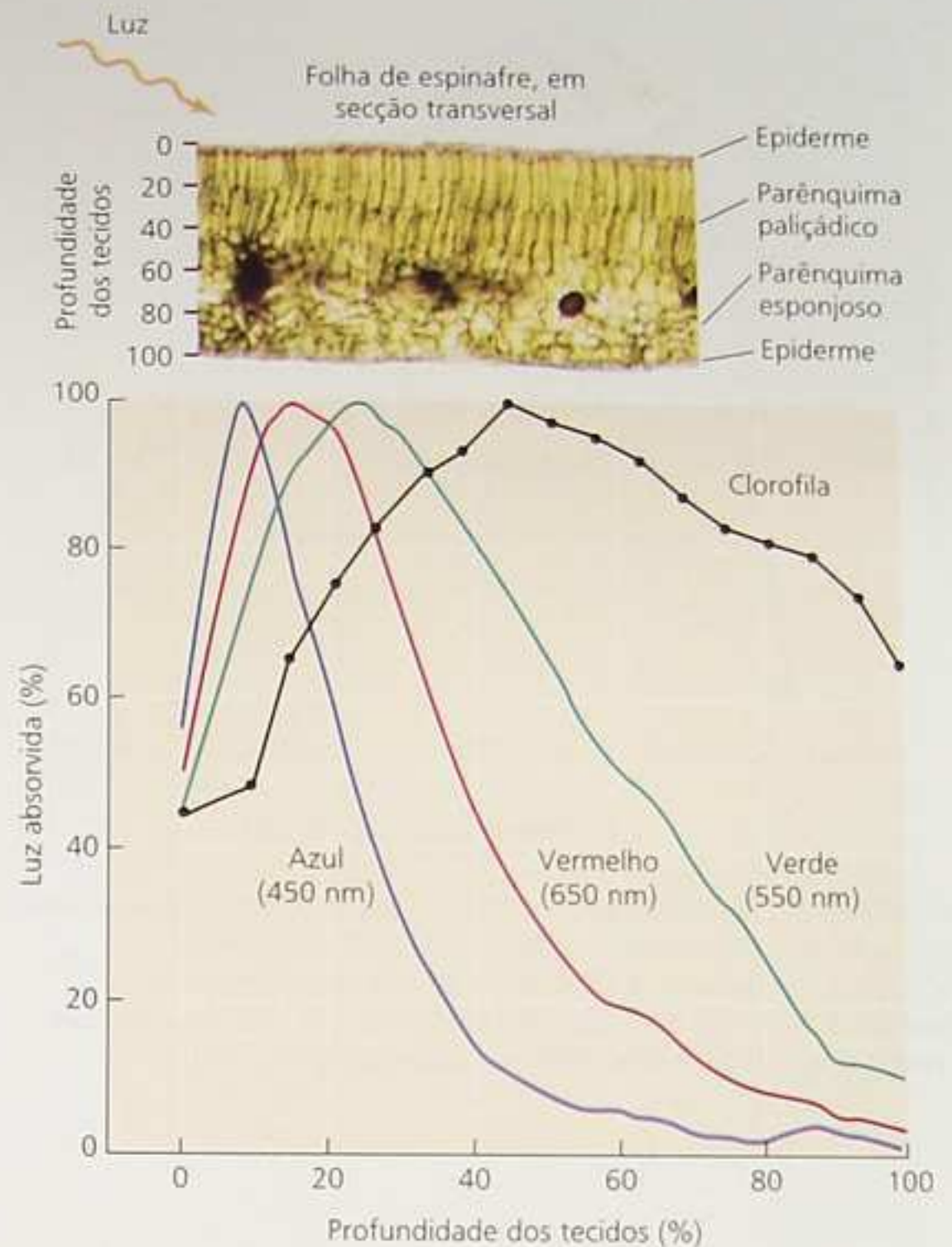



FIGURA 9.18 Distribuição da luz absorvida em folhas de sol de espinafre. A irradiação nas faixas do azul, verde e vermelha determina diferentes perfis de luz absorvida na folha. A fotomicrografia acima do gráfico mostra uma secção transversal de uma folha de espinafre, com fileiras de células paliçádicas ocupando quase a metade da espessura foliar. As formas das curvas resultam, em parte, de uma distribuição desigual de clorofila nos tecidos foliares (Nishio e cols., 1993 e Vogelmann e Han, 2000; fotomicrografia cedida por T. Vogelmann).

O CO_2 impõe limitações à fotossíntese

A expressão da taxa fotossintética como uma função da pressão parcial de CO_2 no espaço intercelular (C_i) dentro da folha (ver **Tópico 9.4 na Internet**) possibilita avaliar as limitações à fotossíntese impostas pelo suprimento de CO_2. Sob concentrações intercelulares de CO_2 muito baixas, a fotossíntese é fortemente limitada, enquanto que as taxas respiratórias não são afetadas. Como resultado, verifica-se um balanço negativo entre o CO_2 fixado pela fotossíntese e o produzido pela respiração e, com isso, um efluxo líquido de CO_2 proveniente da planta.

Aumentando a concentração de CO_2 intercelular até o valor em que esses dois processos se equilibram, atinge-se o **ponto de compensação do CO_2**. Nesse ponto, o efluxo de CO_2 da planta é zero (Figura 9.20 A). Tal conceito é análogo ao do ponto de compensação da luz, discutido anteriormente no capítulo: *o ponto de compensação do CO_2 expressa o balaço entre fotossíntese e respiração em função da concentração do CO_2; o ponto de compensação da luz considera o balanço em função do fluxo fotônico.*

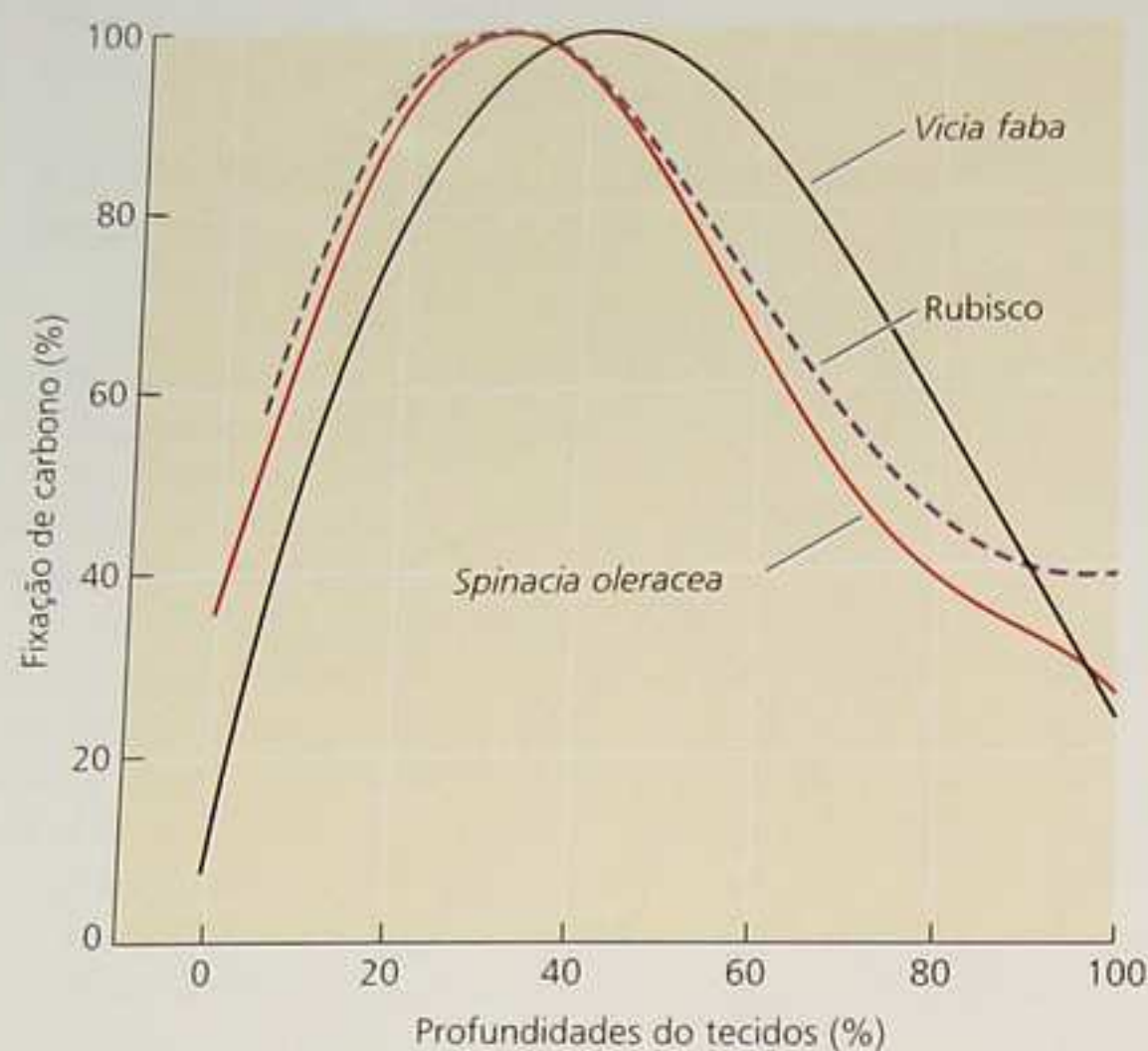



FIGURA 9.19 Distribuição de rubisco e fixação de carbono nas folhas. A fixação de carbono (linha contínua) em folhas de espinafre acompanha exatamente a distribuição interna de rubisco (linha tracejada). As curvas de fixação de carbono da fava e do espinafre são semelhantes (Nishio e cols., 1993; Jeje e Zimmermann, 1983).

FIGURA 9.20 Mudanças na fotossíntese em função das concentrações de CO_2 no ambiente intercelular *em mel* doce do Arizona (*Tidestromia oblongifolia*), uma planta C_4, e creosoto (*Larrea divaricata*), uma planta C_3. A taxa fotossintética está plotada em relação à pressão parcial de CO_2 no ambiente (A) e à pressão parcial intercelular calculada de CO_2 dentro da folha (B) (ver Equação 5 no **Tópico 9.4 na Internet**). A pressão parcial em que a assimilação de CO_2 é zero define o ponto de compensação do CO_2 (Berry e Downton, 1982).

Em plantas C_3, o aumento de CO_2 acima do ponto de compensação estimula a fotossíntese em um amplo espectro de concentração (ver Figura 9.20A). Sob concentrações de CO_2 baixas a intermediárias, a fotossíntese é limitada pela capacidade da carboxilação da rubisco. Sob concentrações de CO_2 altas, a fotossíntese é limitada pela capacidade do ciclo de Calvin de regenerar a molécula aceptora ribulose-1,5-bifosfato, que depende das taxas de transporte de elétrons. Ao regular a condutância estomática, a maioria das folhas parece regular sua C_i (pressão parcial interna de CO_2), de tal modo que ela é intermediária entre as limitações impostas pela capacidade de carboxilação e a capacidade de regenerar ribulose-1,5-bifosfato.

Uma representação gráfica da assimilação de CO_2 como função da pressão parcial de intercelular do CO_2 diz como a fotossíntese está regulada por esse gás, independentemente do funcionamento dos estômatos (Figura 9.20B). A análise da representação gráfica de plantas C_3 e C_4 revela diferenças interessantes entre ambos os tipos de metabolismo do carbono:

- Em *plantas* C_4, as taxas fotossintéticas saturam com valores de C_i de cerca de 15 Pa, refletindo os efetivos mecanismos de concentração de CO_2 que operam nessas plantas (ver Capítulo 8).
- Em *plantas* C_3, o aumento dos níveis de C_i continua a estimular a fotossíntese em um espectro muito mais amplo.

Os resultados alcançados indicam que as plantas C_3 podem se beneficiar de aumentos das concentrações de CO_2 atmosférico (ver Figura 9.16). A fotossíntese de plantas C_4, ao contrário, é saturada por CO_2 em concentrações baixas; com isso, tais plantas não se beneficiam de aumentos das concentrações de CO_2 atmosférico. A Figura 9.20 mostra também que plantas com metabolismo C_4 têm um ponto de compensação do CO_2 de zero ou próximo ao zero, refletindo seus níveis muito baixos de fotorrespiração (ver Capítulo 8). Essa diferença entre plantas C_3 e C_4 não é observada quando os experimentos são realizados com concentrações de oxigênio baixas, pois a oxigenação é também suprimida em plantas C_3.

Os mecanismos que concentram CO_2 afetam as respostas fotossintéticas das folhas

Por causa dos mecanismos concentradores de CO_2 que operam em plantas C_4, a concentração de CO_2 nos sítios de carboxilação em cloroplastos C_4 é freqüentemente saturadora da atividade

da rubisco. Como resultado, as plantas com metabolismo C_4 necessitam de menos rubisco do que as C_3 para alcançar um certa taxa de fotossíntese e exigem menos nitrogênio para crescer (von Caemmerer, 2000).

Além disso, o mecanismo que concentra CO_2 permite à folha manter taxas fotossintéticas altas com valores baixos de C_i, que exigem taxas menores de condutância estomática para uma determinada taxa de fotossíntese. Assim, as plantas C_4 podem usar água e nitrogênio mais eficientemente do que as C_3. Por outro lado, o custo energético adicional do mecanismo concentrador (ver Capítulo 8) torna as plantas C_4 menos eficientes na utilização de luz. Provavelmente, esta é uma das razões pela qual a maioria das plantas adaptadas à sombra pertence ao grupo das C_3.

Muitos cactos e outras plantas suculentas com metabolismo CAM abrem seus estômatos à noite e os fecham durante o dia (Figura 9.21). O CO_2 absorvido durante a noite é fixado em malato (ver Capítulo 8). Uma vez que as temperaturas do ar são muito mais baixas à noite que durante o dia, a perda de água é menor. Com isso, uma quantidade expressiva de água é economizada em relação à quantidade de CO_2 fixado.

A principal restrição ao metabolismo CAM é que a capacidade de armazenagem do ácido málico é limitada e essa limitação restringe a quantidade de absorção de CO_2. No entanto, muitas plantas CAM podem fixar CO_2 via ciclo de Calvin no final do dia, quando os gradientes de temperatura são menos extremos.

Os cladódios (caules achatados) de cactos podem sobreviver por vários meses sem água, após a separação da planta-mãe. Seus estômatos permanecem fechados durante todo o tempo e o CO_2 liberado pela respiração é refixado em malato. Tal processo, que tem sido denominado *CAM ocioso*, permite à planta sobreviver por períodos prolongados com perda de água extremamente reduzida.

FIGURA 9.21 Assimilação fotossintética de carbono, evaporação e condutância estomática de uma planta CAM, uma cactácea (*Opuntia ficus-indica*), durante um período de 24 horas. A planta foi mantida inteira em uma câmara de trocas gasosas, no laboratório. O período escuro está indicado por áreas sombreadas. Ao contrário das plantas com metabolismo C_3 ou C_4, as plantas CAM abrem seus estômatos e fixam CO_2 à noite (Gibson e Nobel, 1986).

A discriminação de isótopos de carbono revela rotas fotossintéticas diferentes

O CO_2 atmosférico contém os isótopos de carbono ^{12}C, ^{13}C e ^{14}C, que ocorrem naturalmente nas proporções 98,9, 1,1 e 10^{-10}%, respectivamente. O $^{14}CO_2$ está presente em quantidades tão pequenas que não têm relevância fisiológica, mas o $^{13}CO_2$ é diferente. As propriedades químicas do $^{13}CO_2$ são idênticas às do $^{12}CO_2$, mas, devido à leve diferença de massa (2,3%), a maioria das plantas assimila menos $^{13}CO_2$ do que $^{12}CO_2$. Em outras palavras, as plantas discriminam contra os isótopos mais pesados de carbono e elas têm razões de ^{13}C para ^{12}C menores do que as encontradas no CO_2 atmosférico. Quão efetivas são as plantas para distinguir entre os dois isótopos de carbono? Embora a discriminação contra ^{13}C seja sutil, a composição de isótopos de plantas revela uma riqueza de informação.

A composição de isótopos de carbono é medida com o uso de um espectrômetro de massa, que fornece a seguinte razão:

$$R = \frac{^{13}CO_2}{^{12}CO_2} \tag{9.1}$$

A **composição de isótopos** de plantas, $\delta^{13}C$, é quantificada sobre uma base por mil (‰):

$$\delta^{13}C\,‰ = \left(\frac{R_{amostra}}{R_{padrão}} - 1\right) \times 1000 \tag{9.2}$$

onde o padrão representa os isótopos de carbono contido em uma belemnite fóssil da formação calcária Pee Dee da Carolina do Sul. O $\delta^{13}C$ do CO_2 atmosférico tem um valor de –8‰, significando que existe menos ^{13}C no CO_2 atmosférico do que é encontrado no carbonato da belemnite-padrão. Quais são alguns valores típicos das razões de isótopos de carbono de plantas? As plantas C_3 têm um $\delta^{13}C$ de aproximadamente –28‰; as plantas C_4 têm um valor médio de –14‰ (Farquhar e cols., 1989). As plantas C_3 e C_4 têm menos ^{13}C do que o isótopo-padrão, significando que houve uma discriminação contra ^{13}C durante o processo fotossintético.

Uma vez que o cálculo por mil envolve multiplicação por 1.000, a real discriminação do isótopo é pequena. Não obstante, as diferenças na discriminação de isótopos de carbono são facilmente detectáveis com espectrômetro de massa. A medição do $\delta^{13}C$ do açúcar de mesa (sacarose) possibilita determinar se a sacarose provém do açúcar da beterraba (uma planta C_3) ou da cana-de-açúcar (uma planta C_4), por exemplo.

Qual a base fisiológica para o esgotamento de ^{13}C em plantas? Uma razão, tanto em plantas C_3 quanto em C_4, é a difusão. O CO_2 difunde-se do ar externo para os sítios de carboxilação dentro das folhas. Como o $^{12}CO_2$ é mais leve do que o $^{13}CO_2$, ele se difunde ligeiramente mais rápido para o sítio de carboxilação, criando uma efetiva discriminação de difusão de –4,4%. Contudo, a etapa maior da discriminação de isótopos é a reação de carboxilação catalisada pela rubisco (Farquhar e cols., 1989).

A rubisco tem um valor de discriminação intrínseco contra ^{13}C de –30%. Por outro lado, a PEP carboxilase, a enzima primária de fixação de CO_2 de plantas C_4, tem um efeito de discriminação de isótopos muito menor (cerca de –2 a –6%). Assim, a diferença inerente entre os efeitos de discriminação das duas enzimas de carboxilação determina as composições de isótopos diferentes observadas em plantas C_3 e C_4 (Farquhar e cols., 1989).

Outras características fisiológicas das plantas afetam a composição de isótopos. Um fator é a pressão parcial de CO_2 nos espaços intercelulares de folhas (C_i). Em plantas C_3, a discriminação potencial por rubisco de –30% não é totalmente expressa porque a disponibilidade de CO_2 no sítio de carboxilação torna-se um fator limitante, restringindo a discriminação por essa enzima. Ocorre mais discriminação quando C_i é alto, como quando os estômatos estão abertos. Estômatos abertos também facilitam a perda de água. Assim, a menor eficiência no uso da água está correlacionada com maior discriminação contra ^{13}C (Farquhar e cols., 1989).

Os combustíveis fósseis têm um $d^{13}C$ de aproximadamente –26%, pois o carbono nesses depósitos provém de organismos que tinham uma rota C_3 de fixação de carbono. Além disso, medições de $d^{13}C$ em fósseis, solos contendo carbonatos e dentes fósseis possibilitam determinar que o desenvolvimento e a prevalência da fotossíntese C4 são relativamente recentes (ver **Tópico 9.5 na Internet**).

As plantas CAM podem ter valores de $d^{13}C$ intermediários entre os de plantas C_3 e C_4. Em plantas CAM que fixam CO_2 à noite via PEP carboxilase, o $\delta^{13}C$ é semelhante ao de plantas C_4. Entretanto, quando algumas plantas CAM são bem hidratadas, elas mudam para o modo C_3, abrindo seus estômatos durante o dia e fixando CO_2 via rubisco. Sob tais condições, a composição de isótopos desloca-se mais na direção da de plantas C_3. Assim, os valores $^{13}C/^{12}C$ de plantas CAM reflete quanto de carbono é fixado por meio da rota C_3 *versus* rota C_4 (ver **Tópico 9.5 na Internet**).

As plantas também fracionam outros isótopos, tais como $^{18}O/^{16}O$ e $^{15}N/^{14}N$, podendo os vários padrões de enriquecimento ou esgotamento de isótopos ser usados como indicadores de rotas ou características metabólicas particulares.

RESPOSTAS FOTOSSINTÉTICAS À TEMPERATURA

Quando a taxa fotossintética é plotada em função da temperatura, a curva tem uma forma de sino característica (Figura 9.22). O braço ascendente da curva representa uma estimulação da fotossíntese dependente da temperatura, até o ótimo; o braço descendente está associado a efeitos deletérios, alguns dos quais reversíveis, mas outros, não.

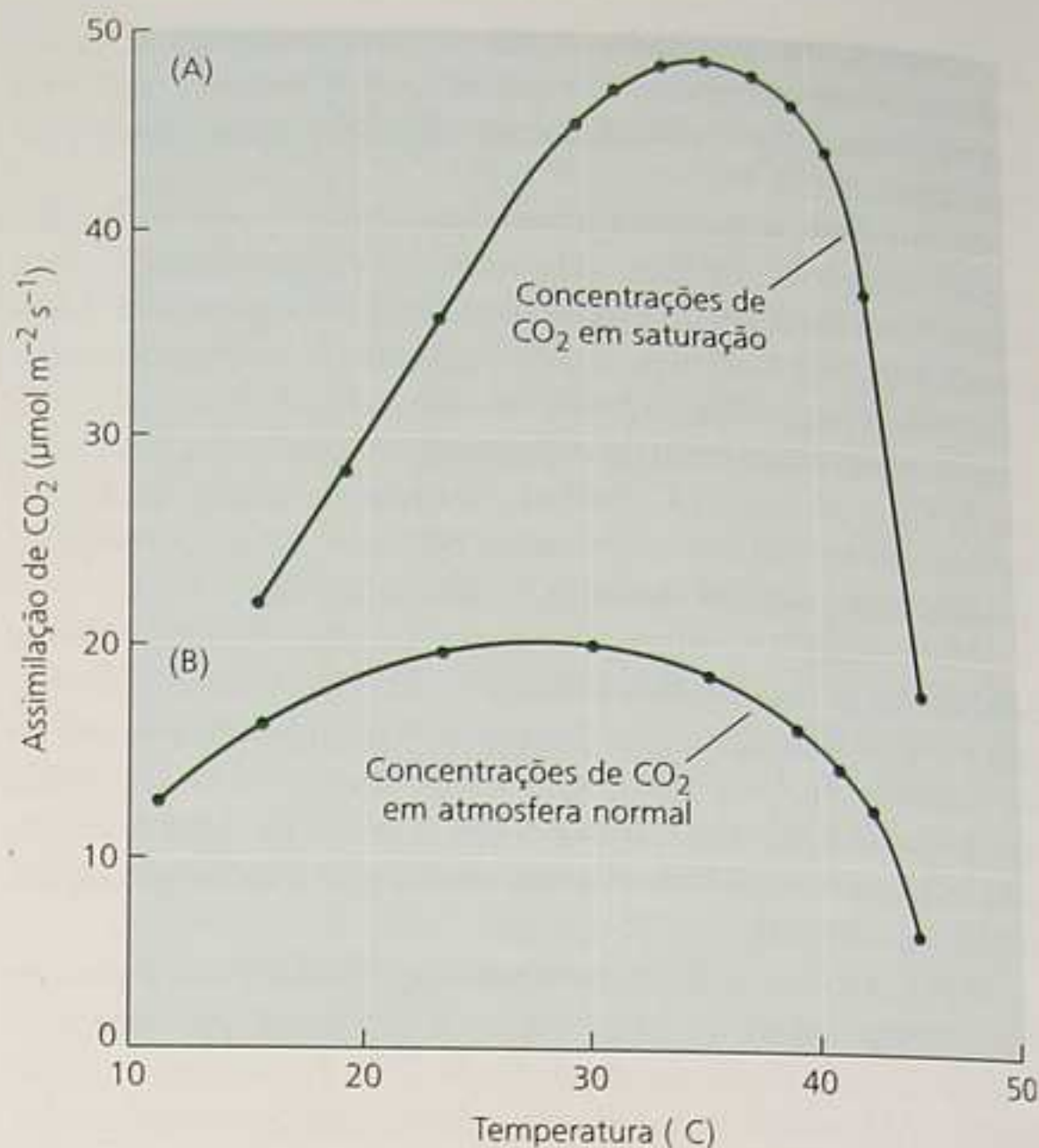



FIGURA 9.22 Alterações da fotossíntese em função da temperatura, sob concentrações de CO_2 que saturam a assimilação fotossintética de CO_2 (A) e sob concentrações de CO_2 em atmosfera normal (B). A fotossíntese depende fortemente da temperatura sob concentrações de CO_2 em saturação. Observe as taxas fotossintéticas significantemente mais altas sob concentrações de CO_2 em saturação (redesenhado de Berry e Björkman, 1980).

A temperatura afeta todas as reações bioquímicas da fotossíntese. Assim, não é surpreendente que as respostas à temperatura sejam complexas. Pode-se conhecer os mecanismos subjacentes pela comparação de taxas fotossintéticas em ar com concentração normal e com concentração alta de CO_2. Sob concentração alta de CO_2 (ver Figura 9.22 A), há um amplo suprimento de CO_2 nos sítios de carboxilação e a taxa de fotosíntese é limitada sobretudo pelas reações bioquímicas conectadas com o transporte de elétrons (ver Capítulo 7). Em tais condições, as alterações de temperatura têm efeitos grandes sobre as taxas de fixação.

Sob concentrações de CO_2 em atmosfera normal (ver Figura 9.22B), a fotosíntese é limitada pela atividade da rubisco e a resposta reflete dois processos conflitantes: um aumento na taxa de carboxilação com a temperatura e um decréscimo na afinidade da rubisco para CO_2 com a elevação da temperatura (ver Capítulo 8). Esses efeitos opostos enfraquecem a resposta à temperatura da fotossíntese sob concentrações de CO_2 em atmosfera normal.

As taxas de respiração também aumentam em função da temperatura e a interação entre fotorrespiração e fotossíntese torna-se aparente nas respostas à temperatura. A Figura 9.23 mostra as alterações no rendimento quântico em função da temperatura em uma planta C_3 e em uma planta C_4. Na planta C_4, o rendimento quântico permanece constante com a temperatura, refletindo as típicas

baixas taxas de fotorrespiração. Na planta C_3, o rendimento quântico decresce com a temperatura, refletindo a estimulação da fotorrespiração pela temperatura e uma decorrente demanda de energia mais alta por CO_2 líquido fixado.

Sob temperaturas baixas, a fotossíntese é freqüentemente limitada pela disponibilidade de fosfato no cloroplasto (Sage e Sharkey, 1987). Quando trioses fosfato são exportadas do cloroplasto para o citosol, uma quantidade equimolar de fosfato inorgânico é captada via translocadores na membrana do cloroplasto.

Se a taxa de utilização de trioses fosfato no citosol decresce, a taxa de absorção de fosfato no cloroplasto é inibida e a fotossíntese torna-se limitada pelo fosfato (Geiger e Servaites, 1994). As sínteses de amido e sacarose diminuem rapidamente com a temperatura, reduzindo a demanda por trioses fosfato e causando a limitação de fosfato observada em temperaturas baixas.

As taxas fotossintéticas mais altas observadas em resposta à temperatura representam assim chamada *resposta à temperatura ótima*. Quando tais temperaturas são ultrapassadas, as taxas fotossintéticas decrescem novamente. Tem sido demonstrado que esta temperatura ótima é o ponto em que as capacidades das várias etapas da fotossíntese estão otimamente equilibradas, com algumas destas etapas tornando-se limitantes quando a temperatura aumenta ou diminui.

As temperaturas ótimas têm fortes componentes genéticos e fisiológicos. As plantas de espécies distintas, crescendo em habitats com temperaturas diferentes, possuem temperaturas ótimas diferentes para a fotossíntese; plantas da mesma espécie, crescendo sob temperaturas diferentes e depois testadas quanto às suas respostas fotossintéticas, apresentam temperaturas ótimas correlacionadas com as temperaturas sob as quais elas cresceram. As plantas que crescem sob temperaturas baixas mantêm taxas fotossintéticas mais altas a temperaturas baixas do que as plantas que crescem sob temperaturas altas.

Tais mudanças nas propriedades fotossintéticas em resposta à temperatura desempenham um papel importante nas adaptações das plantas a ambientes diferentes. As plantas são extraordinariamente plásticas em suas adaptações à temperatura. Na amplitude mais baixa de temperatura, as plantas que crescem em áreas alpinas são capazes de absorção líquida de CO_2 a temperaturas próximas de 0°C; no outro extremo, as plantas que vivem no Vale da Morte (do inglês, *Death Valley*), Califórnia, têm taxas ótimas de fotossíntese a temperaturas próximas a 50°C.

FIGURA 9.23 Rendimento quântico da fixação fotossintética de carbono em uma planta C_3 e em uma planta C_4, em função da temperatura foliar. No ar normal, a fotorrespiração aumenta com a temperatura em plantas C_3 e o custo energético da fixação líquida de CO_2 aumenta de acordo. Este custo energético mais alto é expresso por rendimentos quânticos mais baixos a temperaturas mais altas. Devido aos mecanismos que concentram CO_2 de plantas C_4, a fotorrespiração é baixa nessas plantas e o rendimento quântico não mostra uma dependência da temperatura. Observe que, a temperaturas mais baixas, o rendimento quântico de plantas C_3 é mais alto do que o de plantas C_4, indicando a fotossíntese em plantas C_3 é mais eficiente a temperaturas mais baixas (Ehleringer e Björkman, 1977).

RESUMO

A atividade fotossintética na folha intacta é um processo integral que depende de muitas reações bioquímicas. Fatores ambientais distintos podem limitar as taxas fotossintéticas.

A anatomia foliar é altamente especializada para a absorção de luz. As propriedades do mesofilo, sobremaneira do parênquima paliçádico, garantem a absorção uniforme de luz através da folha. Além das características anatômicas da folha, os movimentos dos cloroplastos nas células e a disposição da lâmina foliar em relação ao sol auxiliam a maximizar a absorção da luz, a qual, transmitida pelas folhas superiores, é absorvida pelas folhas que crescem sob elas.

Muitas propriedades do aparato fotossintético mudam em função da luz disponível, incluindo o ponto de compensação da luz, que é mais alto em folhas de sol do que em folhas de sombra. A parte linear da curva de resposta à luz proporciona uma medida do rendimento quântico da fotossíntese na folha intacta. Em regiões temperadas, os rendimentos quânticos de plantas C_3 são em geral mais altos do que os de plantas C_4.

A luz solar impõe uma substancial carga de calor sobre a folha, que é dissipada de volta para o ar por radiação de comprimento de onda longo, por perda de calor sensível ou por perda de calor evaporativo. Com a elevação das concentrações de CO_2 na atmosfera, aumenta a carga de calor na biosfera. Tal processo poderia provocar mudanças danosas no clima mundial, mas também poderia reduzir as limitações de CO_2 para a fotosíntese. Sob fluxo fotônico alto, a fotossíntese na maioria das plantas é limitada pelo CO_2, mas a limitação é muito menor em plantas C_4 e CAM por causa dos seus mecanismos concentradores de CO_2.

A difusão de CO_2 para a folha é refreada por uma série de diferentes pontos de resistência. A resistência maior é em geral imposta pelos estômatos, de modo que a modulação das aberturas estomáticas fornece à planta meios efetivos de controlar a perda de água e a absorção de CO_2. Fatores estomáticos e não-estomáticos afetam as limitações do CO_2 à fotossíntese.

As respostas da fotossíntese à temperatura refletem a sensibilidade das suas reações bioquímicas a este fator e são mais pronunciadas quando as concentrações de CO_2 são altas. Devido ao papel da fotorrespiração, o rendimento quântico é profundamente dependente da temperatura em plantas C_3, mas é quase independente em plantas C_4.

Sob temperaturas baixas, as folhas de climas frios podem manter taxas fotossintéticas mais altas que folhas de climas mais quen-

tes. Sob temperaturas altas, as folhas de locais quentes têm um desempenho melhor que aquelas que crescem em locais mais frios. As mudanças funcionais no aparato fotossintético, em resposta às temperaturas predominantes em seu ambiente, têm um efeito importante sobre a capacidade de plantas em viver em habitats diversos.

Material da Internet

Tópicos da Internet

9.1 **Trabalhando com luz**
Quantidade, direção e qualidade espectral são parâmetros importantes para a medição da luz.

9.2 **Dissipação de calor das folhas: a razão de Bowen**
A perda de calor sensível e a perda de calor evaporativo são os processos mais importantes na regulação da temperatura foliar.

9.3 **Trabalhando com gases**
Este tópico da Internet explica como trabalhar com frações molares e outros parâmetros físicos de gases.

9.4 **Calculando parâmetros importantes nas trocas gasosas da folha**
Métodos de trocas gasosas permitem medir a fotossíntese e a condutância estomática na folha intacta.

9.5 **Discriminação de isótopos**
A composição de isótopos de carbono de plantas revela uma riqueza de informação.

Ensaio da Internet

9.1 **O ciclo da xantofila**
Estudos moleculares e biofísicos revelam o papel do ciclo da xantofila sobre a fotoproteção de folhas.

Referências bibliográficas

Adams, W. W., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T. N., and Ebbert, V (2001) Dependence of photosynthesis and energy dissipation activity upon growth form and light environment during the winter. *Photosynth. Res.* 67:51-62.

Anderson, J. M. (1986) Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37:93-136.

Bamola, J. M., Raynaud, D., Lorius, C., and Korothevich, Y S. (1994) Historical COZ record from the Vostok ice core. In *Trends '93: A Compendium of Data on Global Change* (ORNL/CDIAC-65), T. A. Boden, D. P Kaiser, R. J. Sepanski, and F. W. Stoss, eds., Carbon Dioxide Information Center, Oak Ridge National Laboratory Oak Ridge, TN, pp. 7-10.

Berry, J., and Björkman, O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:491-543.

Berry, J. A., and Downton, J. S. (1982) Environmental regulation of photosynthesis. In *Photosynthesis: Development, Carbon Metabolism and Plant Productivity, Vol. II*, Govindjee, ed., Academic Press, New York, pp. 263-343.

Björkman, O. (1981) Responses to different quantum flux densities. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12A, O. L. Lange, P S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Zeigler, eds., Springer, Berlin, pp. 57-107.

Björn, L. O., and Vogelmann, T. C. (1994) Quantification of light. In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 17-25.

Bowes, G. (1993) Facing the inevitable: Plants and increasing atmospheric COT *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:309-332.

Campbell, G. S. (1977) *An Introduction to Environmental Biophysics*. Springer-Verlag, New York.

Demmig-Adams, B., and Adams, W. (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* 1: 21-26.

Ehleringer, J. R., Björkman, O., and Mooney H. A. (1976) Leaf pubescence: Effects on absorptance and photosynthesis in a desert shrub. *Science* 192: 376-377.

Ehleringer, J. R., and Björkman, O. (1977) Quantum yields for COZ uptake in C3 and C4 plants. *Plant Physiol.* 59: 86-90.

Ehleringer, J. R., Sage, R. F., Flanagan, L. B., and Pearcy R. W. (1991) Climate change and the evolution of C4 photosynthesis. *Trends Ecol. Evol.* 6: 95-99.

Evans, J. R. (1999) Leaf anatomy enables more equal access to light and COz between chloroplasts. *New Phytol* 143: 93-104.

Farquhar, G. D., Ehleringer, J. R., and Hubick, K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 503-538.

Geiger, D. R., and Servaites, J. C. (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 235-256.

Gibson, A. C., and Nobel, P S. (1986) *The Cactus Primer*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Gorton, H. L., Williams, W. E., and Vogelmann, T. C. (1999) Chloroplast movement in *Alocasia* macrorrhiza. *Physiol. Plant.* 106: 421-128.

Harvey, G. W. (1979) Photosynthetic performance of isolated leaf cells from sun and shade plants. *Carnegie Inst. Washington Yearbook* 79: 161-164.

Haupt, W, and Scheuerlein, R. (1990) Chloroplast movement. *Plant Cell Environ.* 13: 595-614.

Havaux, M., Tardy, F., Ravenel, J., Chanu, D., and Parot, P. (1996) Thylakoid membrane stability to heat stress studied by flash spectroscopic measurements of the electrochromic shift in intact potato leaves: Influence of the xanthophyll content. *Plant Cell Environ.* 19: 1359-1368.

Jarvis, P. G., and Leverenz, J. W. (1983) Productivity of temperate, deciduous and evergreen forests. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12D, O. L. Lange, P S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Zeigler, eds., Springer, Berlin, pp. 233-280.

Jeje, A., and Zimmermann, M. (1983) The anisotropy of the mesophyll and COz capture sites in *Vicia faba* L. leaves at low light intensities. *J. Exp. Bot.* 34: 1676-1694.

Keeling, C. D., and Whorf, T. P (1994) Atmospheric COz records from sites in the SIO air sampling network. In *Trends '93: A Compendium of Data on Global Change* (ORNL/CDIAC-65), T. A. Boden, D. P Kaiser, R. J. Sepanski, and F W. Stoss, eds., Carbon Dioxide Information Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, pp. 16-26.

Keeling, C. D., Whorf, T. P, Wahlen, M., and Van der Plicht, J. (1995) Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature* 375: 666-670.

Koller, D. (1990) Light-driven leaf movements. *Plant Cell Environ.* 13: 615-632.

Koller, D. (2000) Plants in search of sunlight. *Adv. Bot. Res.* 33: 3,5-131.

Long, S. P., Humphries, S., and Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-662.

McCree, K. J. (1981) Photosynthetically active radiation. In *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 12A, O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond, and H. Zeigler, eds., Springer, Berlin, pp. 41-55.

Melis, A. (1996) Excitation energy transfer: Functional and dynamic aspects of Lhc (cab) proteins. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, D. R. Ort and C. F. Yocum, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 523-538.

Neftel, A., Friedle, H., Moor, E., Lotscher, H., Oeschger, H., Siegenthaler, U., and Stauffer, B. (1994) Historical COz record from the Siple Station ice core. In *Trends '93: A Compendium of Data on Global Change* (ORNL/CDIAC-65), T. A. Boden, D. P Kaiser, R. J. Sepanski, and F W. Stoss, eds., Carbon Dioxide Information Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, pp.11-15.

Nishio, J. N., Sun, J., and Vogelmann, T. C. (1993) Carbon fixation gradients across spinach leaves do not follow internal light gradient. *Plant Cell* 5: 953-961.

O'Leary, M. H. (1988) Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* 38: 328-333.

Ort, D. R., and Baker, N. R. (1988) Consideration of photosynthetic efficiency at low light as a major determinant of crop photosynthetic performance. *Plant Physiol. Biochem.* 26: 555-565.

Osmond, C. B. (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In *Photoinhibition of Photosynthesis: From Molecular Mechanisms to the Field.* N. R. Baker and J. R. Bowyer, eds., BIOS Scientific, Oxford, pp. 1-24.

Pearcy, R. W., Gross, L. J., and He, D. (1997) An improved dynamic model of photosynthesis for estimation of carbon gain in sunfleck light regimes. *Plant Cell Environ.* 20:411-424.

Richter, T., and Fukshansky L. (1996) Optics of a bifacial leaf: 2. Light regime as affected by leaf structure and the light source. *Photochem. Photobiol.* 63: 517-527.

Rupert, C. S., and Letarjet, R. (1978) Toward a nomenclature and dosimetric scheme applicable to all radiations. *Photochem. Photobiol.* 28:3-5.

Sage, R. F., and Sharkey, T. D. (1987) The effect of temperature on the occurrence of OZ and COZ insensitive photosynthesis in field grown plants. *Plant Physiol.* 84: 658-664.

Sharkey T. D. (1996) Emission of low molecular mass hydrocarbons from plants. *Trends Plant Sci.* 1: 78-82.

Sharkey, T. D., and Singsaas, E. L. (1995) Why plants emit isoprene. *Nature* 374: 769.

Sharkey, T. D., Chen, X., and Yeh, S. (2001) Isoprene increases thermotolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiol.* 125: 2001-2006.

Smith, H. (1986). The perception of light quality. In *Photomorphogenesis in Plants,* R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, pp.187-217.

Smith, H. (1994). Sensing the light environment: The functions of the phytochrome family. In *Photomorphogenesis in Plants,* 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, pp. 377-416.

Syvertsen, J. P, Lloyd, J., McConchie, C., Kriedemann, P E., and Farquhar, G. D. (1995) On the relationship between leaf anatomy and COZ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant Cell Environ.* 18: 149-157.

Terashima, I. (1992) Anatomy of non-uniform leaf photosynthesis. *Photosynth. Res.* 31: 195-212.

Terashima, I., and Hikosaka, K. (1995) Comparative ecophysiology of leaf and canopy photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 18: 1111-1128.

Tlalka, M., and Fricker, M. (1999) The role of calcium in blue-lightdependent chloroplast movement in *Lemna trisulca L. Plant J.* 20: 461-473.

Vogelmann, T. C. (1993) Plant tissue optics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 231-251.

Vogelmann, T. C., and Björn, L. O. (1983) Response to directional light by leaves of a sun-tracking lupine *(Lupinus succulentus). Physiol. Plant.* 59: 533-538.

Vogelmann, T. C., and Han, T. (2000) Measurement of gradients of absorbed light in spinach leaves from chlorophyll fluorescence profiles. *Plant Cell Environ.* 23:1303-1311.

Vogelmann, T. C., Bornman, J. R, and Yates, D. J. (1996) Focusing of light by leaf epidermal cells. *Physiol. Plant.* 98: 43-56.

von Caemmerer, S. (2000) *Biochemical Models of Leaf Photosynthesis.* CSIRO, Melbourne, Australia.

Capítulo

10 *Translocação no floema*

A SOBREVIVÊNCIA NO AMBIENTE TERRESTRE REPRESENTOU SÉRIOS DESAFIOS às plantas, entre os quais destaca-se principalmente a necessidade de obter e de reter a água. Em resposta a tais pressões ambientais, as plantas desenvolveram raízes e folhas. As raízes fixam as plantas e absorvem água e nutrientes; as folhas absorvem luz e realizam as trocas gasosas. À medida que as plantas crescem, as raízes e as folhas tornam-se gradativamente separadas no espaço. Assim, os sistemas evoluíram e desenvolveram transporte de longa distância, o que permite eficientemente a troca dos produtos da absorção e da assimilação entre a parte aérea e as raízes.

Os Capítulos 4 e 6 mostraram que o xilema é o tecido que transporta água e sais minerais a partir sistema radicular (ver Glossário) até as partes aéreas das plantas. O **floema** é o tecido que transloca os produtos da fotossíntese das folhas maduras para as áreas de crescimento e armazenagem, incluindo as raízes. Como será visto, o floema também redistribui a água e os vários compostos através do corpo da planta. Tais compostos, alguns dos quais chegam inicialmente nas folhas maduras por intermédio do xilema, podem ser redistribuídos a partir das folhas, tanto sem modificação quanto metabolizados.

A discussão que segue enfatiza a translocação no floema das angiospermas, já que a maioria das pesquisas tem sido desenvolvida nesse grupo de plantas. As gimnospermas serão comparadas brevemente às angiospermas em termos da anatomia das células condutoras e das possíveis diferenças nos seus mecanismos de translocação. Inicialmente, serão examinados alguns aspectos da translocação no floema, os quais têm sido extensivamente estudados e compreendidos. Esses aspectos incluem a rota e os padrões de translocação, os materiais translocados no floema e as taxas de movimento.

Na segunda parte deste capítulo, serão explorados os aspectos de translocação no floema que necessitam de investigação adicional. Algumas dessas áreas, tais como o carregamento e o descarregamento, assim como a alocação e a partição dos produtos fotossintéticos estão sendo investigados exaustivamente na atualidade.

ROTAS DE TRANSLOCAÇÃO

As duas rotas de transporte de longa distância — o floema e o xilema — estendem-se por toda planta. O floema é em geral encontrado na face externa dos tecidos vasculares, primário e secundário (Figuras 10.1 e 10.2). Nas plantas com crescimento secundário, o floema constitui a casca viva.

As células do floema, que conduzem açúcares e outros compostos orgânicos através da planta, são chamadas de **elementos crivados.** *Elemento crivado* é uma expressão abrangente que inclui tanto os **elementos de tubo crivado** altamente diferenciados típicos das angiospermas e as **células crivadas,** relativamente não-especializadas, das gimnospermas. Além dos elementos crivados, o tecido do floema contém as células companheiras (discutidas adiante) e as células parenquimáticas (que armazenam e liberam moléculas nutritivas). Em alguns casos, o tecido do floema também inclui fibras e esclereídes (para proteção e sustentação do tecido) e os laticíferos (células que contêm látex). Porém, apenas os elementos crivados estão envolvidos diretamente na translocação.

As nervuras de menor porte das folhas e os feixes vasculares primários dos caules são freqüentemente circundados por uma **bainha vascular** (ver Figura 10.1), a qual consiste de uma ou mais camada de células compactamente arranjadas (lembre-se das células da bainha vascular envolvidas no metabolismo C_4, discutido no Capítulo 8). No tecido vascular das folhas, a bainha do feixe circunda as nervuras menores em toda sua extensão até as suas extremidades, isolando as nervuras dos espaços intercelulares da folha.

Inicialmente, serão discutidas as evidências experimentais das rotas de translocação, demonstrando que os elementos crivados são as células condutoras do floema. Após, serão examinadas a estrutura e a fisiologia dessas células vegetais singulares.

O açúcar é translocado nos elementos crivados

Experimentos iniciais sobre o transporte do floema datam do século XIX, indicando a importância do transporte de longa distância nos vegetais (ver **Tópico 10.1 na Internet**). Estes experimentos clássicos demonstraram que a remoção de um anel da casca ao redor do tronco de uma árvore, que remove o floema, interrompe efetivamente o transporte de açúcar das folhas para as raízes, sem alterar o transporte de água através do xilema. Quando os compostos radioativos tornaram-se disponíveis, o CO_2^{14} marcado foi utilizado para demonstrar que os açúcares produzidos pelo processo fotossintético são translocados pelos elementos crivados do floema (ver **Tópico 10.1 na Internet**).

Elementos crivados maduros são células vivas altamente especializadas para translocação

O conhecimento detalhado da ultra-estrutura dos elementos crivados é crítico para qualquer discussão do mecanismo de translocação no floema. Os elementos crivados maduros são únicos entre as células vegetais vivas (Figuras 10.3 e 10.4). Neles estão ausentes muitas das estruturas encontradas nas células vivas, mesmo em células não-diferenciadas, a partir das quais os elementos crivados maduros são formados. Por exemplo, os elementos crivados perdem seus núcleos e tonoplastos (membrana do vacúolo) durante o desenvolvimento. Os microfilamentos, os microtúbulos, o complexo de Golgi e os ribossomos estão também ausentes nas

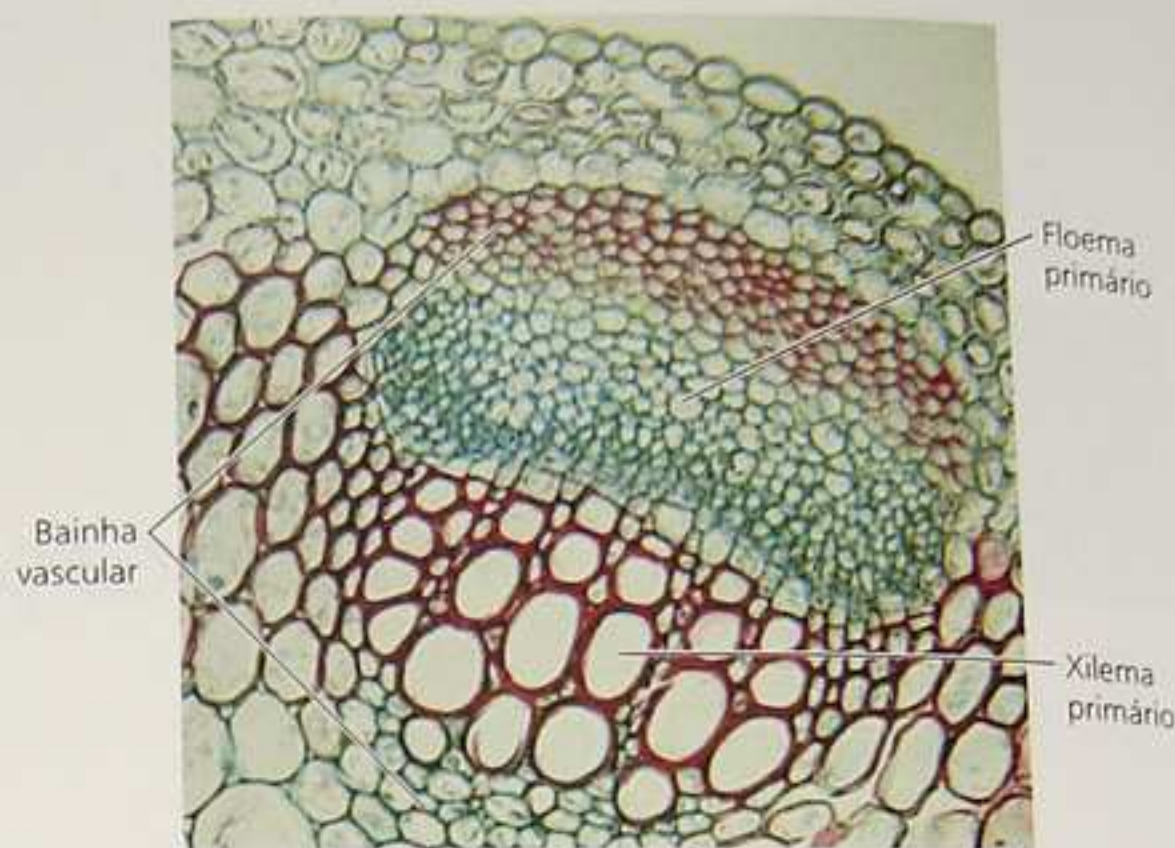



FIGURA 10.1 Seção transversal do feixe vascular de trevo (*Trifolium*) (130x). O floema primário está em direção à superfície externa do caule. Tanto o floema quanto o xilema primários são circundados por uma bainha vascular formada de células de esclerênquima de paredes celulares espessas, que isolam o tecido vascular do tecido fundamental (© J.N.A. Lott/Biological Photo Service).

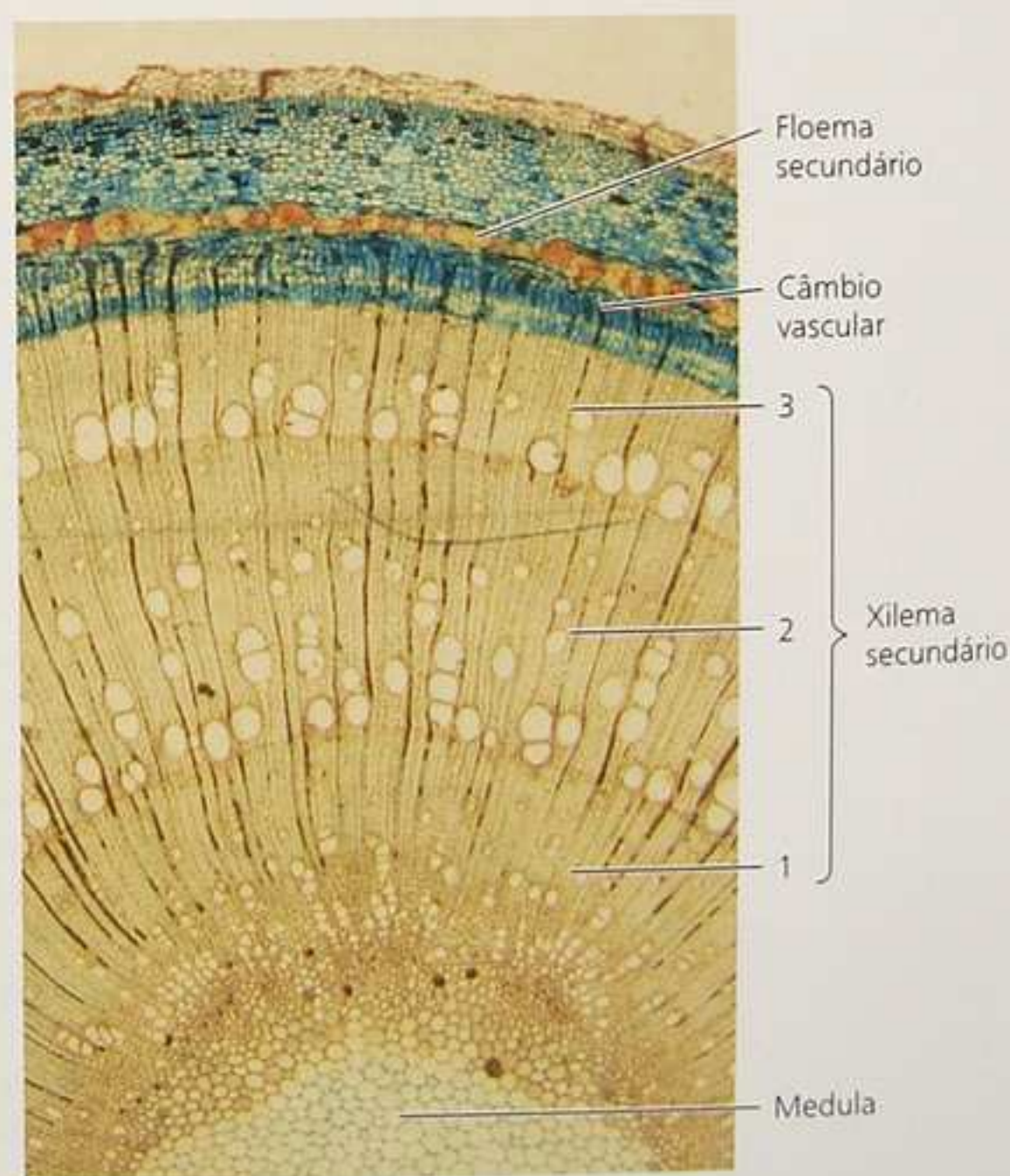



FIGURA 10.2 Seção transversal de um caule de três anos de uma árvore de freixo (*Fraxinus excelsior*) (27x). Os números 1, 2 e 3 indicam os anéis de crescimento no xilema secundário. O floema secundário velho foi comprimido pela expansão do xilema. Somente a camada mais recente (mais interna) do floema secundário é funcional (© P. Gates/Biological Photo Service).

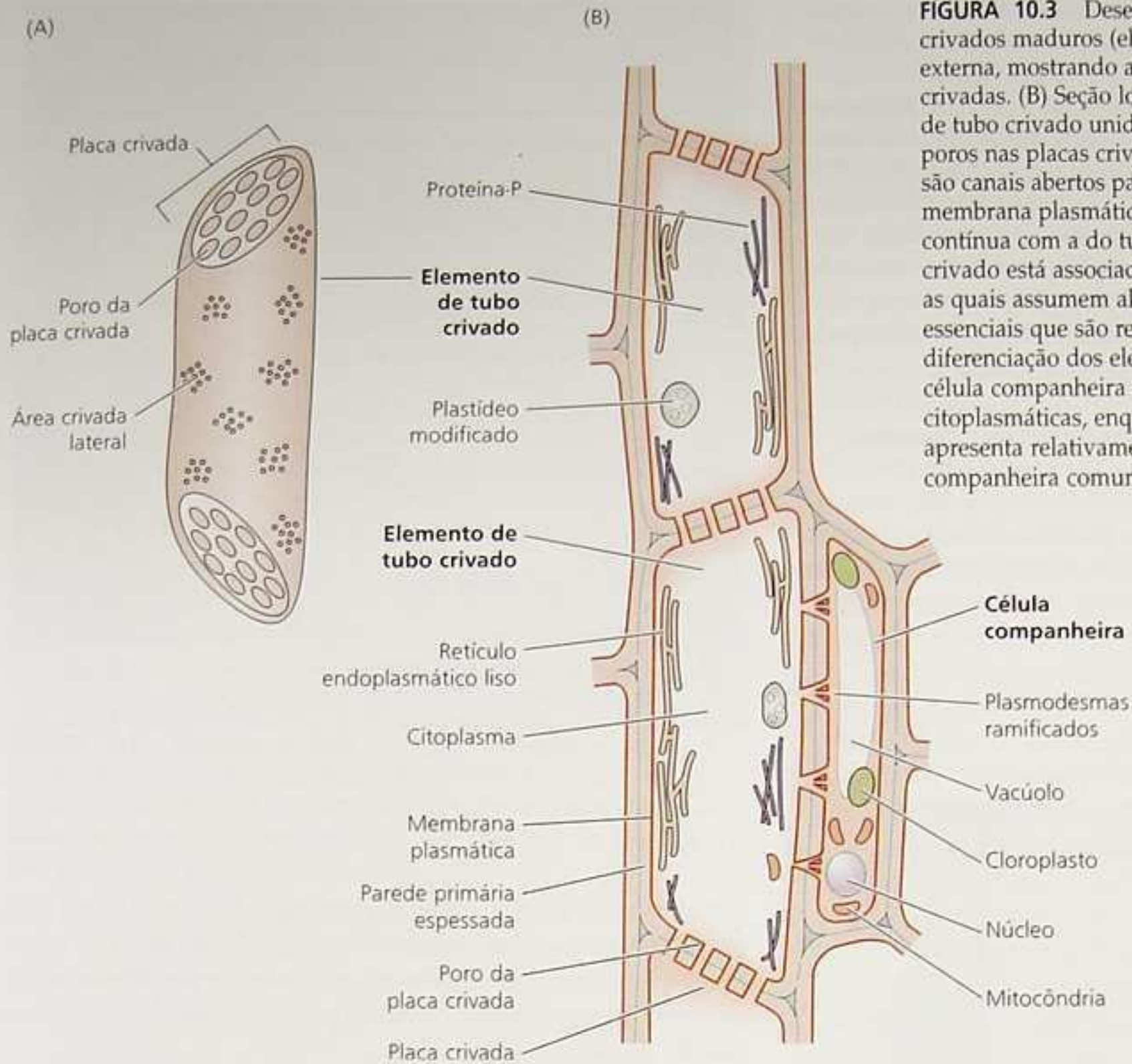



FIGURA 10.3 Desenho esquemático de elementos crivados maduros (elementos de tubo crivado). (A) Vista externa, mostrando as placas crivadas e áreas laterais crivadas. (B) Seção longitudinal, mostrando dois elementos de tubo crivado unidos, formando um tubo crivado. Os poros nas placas crivadas entre os elementos de tubo crivado são canais abertos para transporte através do tubo. A membrana plasmática de um elemento de tubo crivado é contínua com a do tubo adjacente. Cada elemento de tubo crivado está associado a uma ou mais células companheiras, as quais assumem algumas das funções metabólicas essenciais que são reduzidas ou perdidas durante a diferenciação dos elementos de tubo crivado. Observe que a célula companheira apresenta muitas organelas citoplasmáticas, enquanto que o elemento de tubo crivado apresenta relativamente poucas organelas. Uma célula companheira comum está aqui representada.

células maduras. Além da membrana plasmática, as organelas mantidas incluem algumas mitocôndrias relativamente modificadas, plastídeos e retículo endoplasmático liso. As paredes não são lignificadas, embora haja um espessamento secundário em alguns casos.

Nesse sentido, os elementos crivados apresentam uma estrutura celular diferente daquela dos elementos traqueais (mortos na maturidade), os quais não apresentam membrana plasmática e as paredes secundárias são lignificadas. Como será visto, as células vivas são críticas para o mecanismo de translocação no floema.

A presença de áreas crivadas é a característica principal dos elementos crivados

Os elementos crivados (células crivadas e elementos de tubo crivado) apresentam áreas crivadas características nas suas células, onde poros interconectam as células condutoras (ver Figura 10.5). Os poros das áreas crivadas variam em diâmetro de menos de 1 µm a aproximadamente 15 µm. Ao contrário das áreas crivadas das gimnospermas, as áreas crivadas das angiospermas podem se diferenciar em **placas crivadas** (ver Figura 10.5 e Tabela 10.1).

As placas crivadas apresentam poros maiores do que outras áreas crivadas na célula e são geralmente encontradas nas extremidades das paredes dos elementos de tubo crivado, onde as células individuais são unidas para formar séries longitudinais

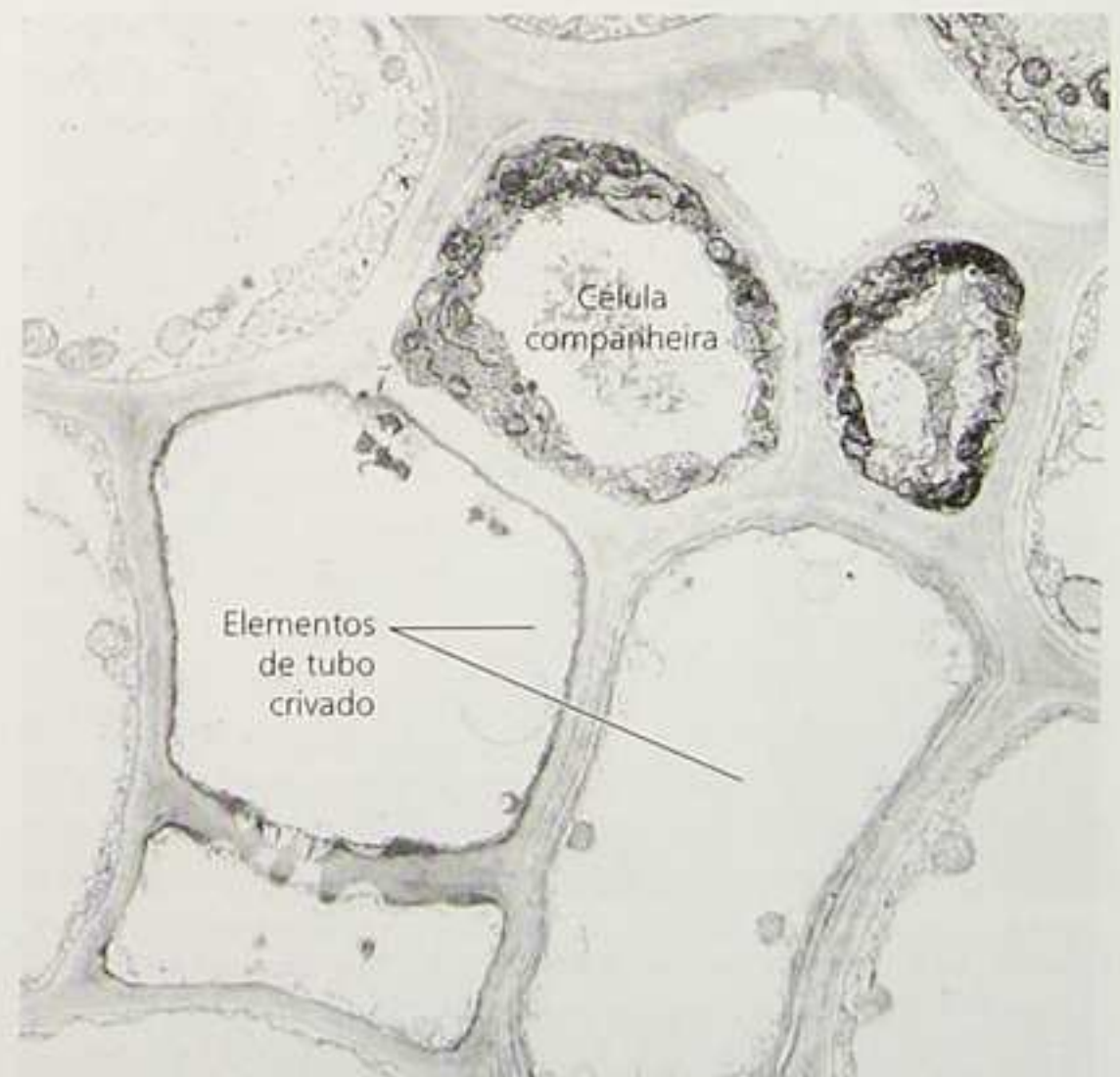



FIGURA 10.4 Electromicrografia de uma seção transversal de células companheiras ordinárias e elementos de tubo crivado maduros (3.600x) Os componentes celulares são distribuídos ao longo das paredes dos elementos de tubo crivado (Warmbrodt, 1985).

denominadas **tubos crivados** (ver Figura 10.3). Além disso, os poros da placa crivada dos elementos de tubo crivado são canais abertos que permitem o transporte pelas células (ver Figura 10.5).

Por outro lado, todas as áreas crivadas são mais ou menos similares nas gimnospermas, tais como coníferas. Os poros das áreas crivadas das gimnospermas encontram-se em grandes cavidades medianas no meio da parede celular. O retículo endoplasmático liso (REL) cobre as áreas crivadas (Figura 10.6) e é contínuo através dos poros crivados e da cavidade mediana, conforme indicado pela coloração específica do RE. A observação do material vivo, com microscopia confocal, confirma que a distribuição observada do REL não é um artefato da fixação (Schulz, 1992).

TABELA 10.1
Características de dois tipos de elementos crivados em espermatófitas

Elementos de tubo crivado encontrados em angiospermas

1. Algumas áreas crivadas são diferenciadas em placas crivadas; elementos de tubo crivado individuais são unidos em um tubo crivado.
2. Os poros da placa crivada são canais abertos.
3. A proteína-P está presente em todas as dicotiledôneas e em muitas monocotiledôneas.
4. Células companheiras são fontes de ATP e talvez de outros compostos e, em algumas espécies, são células de transferência ou intermediárias.

Células crivadas encontradas em gimnospermas

1. Não há placas crivadas; todas as áreas crivadas são similares.
2. Os poros nas áreas crivadas parecem estar bloqueados com membranas.
3. Não há proteína-P.
4. Células albuminosas algumas vezes agem como células companheiras.

O depósito de proteína-P e de calose sela os elementos danificados de tubo crivado

Os elementos de tubo crivado da maioria das angiospermas são ricos em uma proteína do floema denominada **proteína-P** (ver Figura 10.3B) (Clark e cols., 1997) (na literatura clássica, a proteína-P era chamada de *mucilagem*). A proteína-P é encontrada em todas as dicotiledôneas e em muitas monocotiledôneas, mas está ausente nas gimnospermas. Ela ocorre em várias formas diferentes (tubular, fibrilar, granular e cristalina), dependendo da espécie e do estádio de maturação da célula.

Em células imaturas, a proteína-P é mais evidente como corpos distintos no citosol, conhecidos como **corpos de proteína-P**. Os corpos de proteínas-P podem ser esferoidais, em forma de fuso, ou torcido e espiral. Eles geralmente assumem as formas tubular ou fibrilar durante a maturação da célula.

As proteínas-P têm sido caracterizadas em nível molecular. Por exemplo, as proteínas-P encontradas no gênero *Cucurbita* consistem de duas proteínas principais: a PP1, a proteína filamentosa do floema, e a PP2, a lectina do floema. O gene que codifica a PP1 em abóbora (*Cucurbita maxima*) apresenta seqüência semelhante aos genes que codificam os inibidores cisteína-protease, sugerindo uma possível função na defesa contra insetos sugadores. Acredita-se que ambas, PP1 e PP2, sejam sintetizadas nas células companheiras (discutido na próxima seção) e transportadas pelos plasmodesmas para os elementos crivados, onde se associam para formar os filamentos de proteína-P e os corpos de proteína-P (Clark e cols., 1997).

A proteína-P parece agir na vedação de elementos crivados danificados por obstruir os poros das placas crivadas. Os tubos crivados estão sob uma pressão de turgor interna muito alta e os elementos crivados em um tubo crivado estão conectados pelos poros abertos das placas crivadas. Quando um tubo crivado é cortado ou perfurado, a diminuição da pressão provoca o deslocamento do conteúdo dos elementos crivados em direção à extremidade cortada, podendo levar a planta a perder muita seiva do floema rica em açúcar, se não houvesse um mecanismo de vedação (*seiva* é um termo geral usado para referir o conteúdo fluido das células vegetais). Entretanto, quando esse deslocamento ocor-

FIGURA 10.5 Elementos crivados e poros abertos da placa crivada. (A) Electromicrografia de uma seção longitudinal de dois elementos crivados maduros (elementos de tubo crivado), mostrando a parede entre os elementos crivados (denominados uma placa crivada) no hipocótilo de abóbora (*Cucurbita maxima*) (3.685x). (B) O detalhe mostra os poros de uma placa crivada na visão frontal. (4.280x). Em ambas as imagens, A e B, os poros da placa crivada estão abertos — isto é, não-obstruídos pela proteína-P (Evert, 1982).

FIGURA 10.6 Electromicrografia ilustrando uma área crivada (ac) ligando duas células crivadas em conífera (*Pinus resinosa*). O retículo endoplasmático liso (REL) recobre a área crivada em ambos os lados e é também encontrado nos poros e na cavidade mediana. Os plastídeos (P) são circundados pelo REL (Schulz, 1990).

re, a proteína-P e outras inclusões celulares ficam presas nos poros da placa crivada, auxiliando na vedação do elemento crivado e na prevenção da perda adicional de seiva.

Uma solução em longo prazo para o dano no tubo crivado é a produção de **calose** nos poros da placa crivada. A calose, um β-1,3-glucano, é sintetizada por uma enzima na membrana plasmática e depositada entre a membrana e a parede celular. A calose é sintetizada em um elemento crivado funcional em resposta à lesão e a outros estresses, tais como estímulo mecânico e altas temperaturas, ou em preparação para os eventos normais do desenvolvimento, como a dormência. O depósito de **calose de lesão** nos poros da placa crivada isola eficientemente os elementos crivados danificados do tecido intacto adjacente. À medida que os elementos crivados recuperam-se das lesões, a calose desaparece desses poros.

As células companheiras auxiliam os elementos crivados altamente especializados

Cada elemento de tubo crivado está associado a uma ou mais **células companheiras** (ver Figuras 10.3B, 10.4 e 10.5). A divisão de uma única célula-mãe forma o elemento de tubo crivado e a célula companheira. Numerosos plasmodesmas (ver Capítulo 1) atravessam as paredes entre os elementos de tubo crivado e suas células companheiras, indicando uma relação funcional estrita e uma troca de solutos entre as duas células. Os plasmodesmas são freqüentemente complexos e ramificados no lado da célula companheira.

As células companheiras exercem função no transporte dos produtos fotossintéticos a partir das células produtoras nas folhas maduras para os elementos crivados nas nervuras menores da folha. Acredita-se que elas também assumam funções metabólicas críticas, como a síntese protéica, que são reduzidas ou perdidas durante a diferenciação dos elementos crivados (Bostwick e cols., 1992). Além disso, as numerosas mitocôndrias das células companheiras podem fornecer energia como ATP aos elementos crivados.

Há pelo menos três tipos diferentes de células companheiras nas nervuras menores das folhas maduras, exportadoras: células companheiras, células de transferência e células intermediárias. Esses três tipos de células apresentam citoplasma denso e mitocôndrias abundantes.

As células companheiras (Figura 10.7A) apresentam cloroplastos com tilacóides bem desenvolvidos e uma parede celular com superfície interna lisa. Uma constatação importante é que relativamente poucos plasmodesmas conectam este tipo de célula a qualquer uma das células adjacentes, com exceção do seu próprio elemento crivado. Como resultado, o simplasto do elemento crivado e sua célula companheira são relativamente, se não completamente, isolados do simplasto das células adjacentes.

As células de transferência são semelhantes às células companheiras, com exceção do desenvolvimento de invaginações da parede do tipo de interdigitações, em particular nas paredes celulares da face oposta ao elemento crivado (Figura 10.7B). Tais invaginações da parede aumentam a superfície da membrana plasmática, aumentando, assim, o potencial de transferência de soluto pela membrana.

Em decorrência da escassez de conexões citoplasmáticas com as células adjacentes e com as invaginações das células de transferência, acredita-se que a célula companheira e a célula de transferência são especializadas na absorção de solutos do apoplasto ou do espaço da parede celular. As células parenquimáticas do xilema também podem ser modificadas como células de transferência, servindo provavelmente para recuperar e redirecionar os solutos em movimento no xilema, o qual faz também parte do apoplasto.

Embora os simplastos das células companheiras e das de transferência estejam relativamente isolados das células adjacentes, há alguns plasmodesmas nas paredes destas células. A função desses plasmodesmas não é conhecida. O fato de estarem presentes indica que eles devem possuir uma função importante, visto que o custo de possuí-los é alto: eles são as vias pelas quais os vírus tornam-se sistêmicos na planta. Entretanto, são difíceis de estudar por serem inacessíveis.

As células intermediárias parecem ser apropriadas para a absorção de solutos através de conexões citoplasmáticas (Figura 10.7C). As células intermediárias apresentam numerosos plasmodesmas que as conectam com as células adjacentes, em particular as células da bainha do feixe vascular. Embora a presença de muitas conexões por plasmodesmas às células adjacentes seja seu aspecto mais característico, as células intermediárias também se distinguem por possuir numerosos vacúolos, bem como tilacóides pouco desenvolvidos e ausência de grãos de amido nos cloroplastos.

Em geral, as células companheiras e as de transferência são encontradas nos vegetais que apresentam uma etapa apoplástica na transferência de açúcares das células do mesofilo aos elementos crivados. As células companheiras e as de transferência levam açúcares do apoplasto para o simplasto dos elementos crivados e células companheiras na região fonte. Por outro lado, as células

(A)

Célula companheira ordinária
Elementos crivados
Célula intermediária

(B)

Célula de transferência
Elemento crivado
Célula do parênquima
Invaginações da parede
Plasmodesmas

(C)

Célula parenquimática vascular
Elementos crivados
Célula intermediária
Células da bainha do feixe

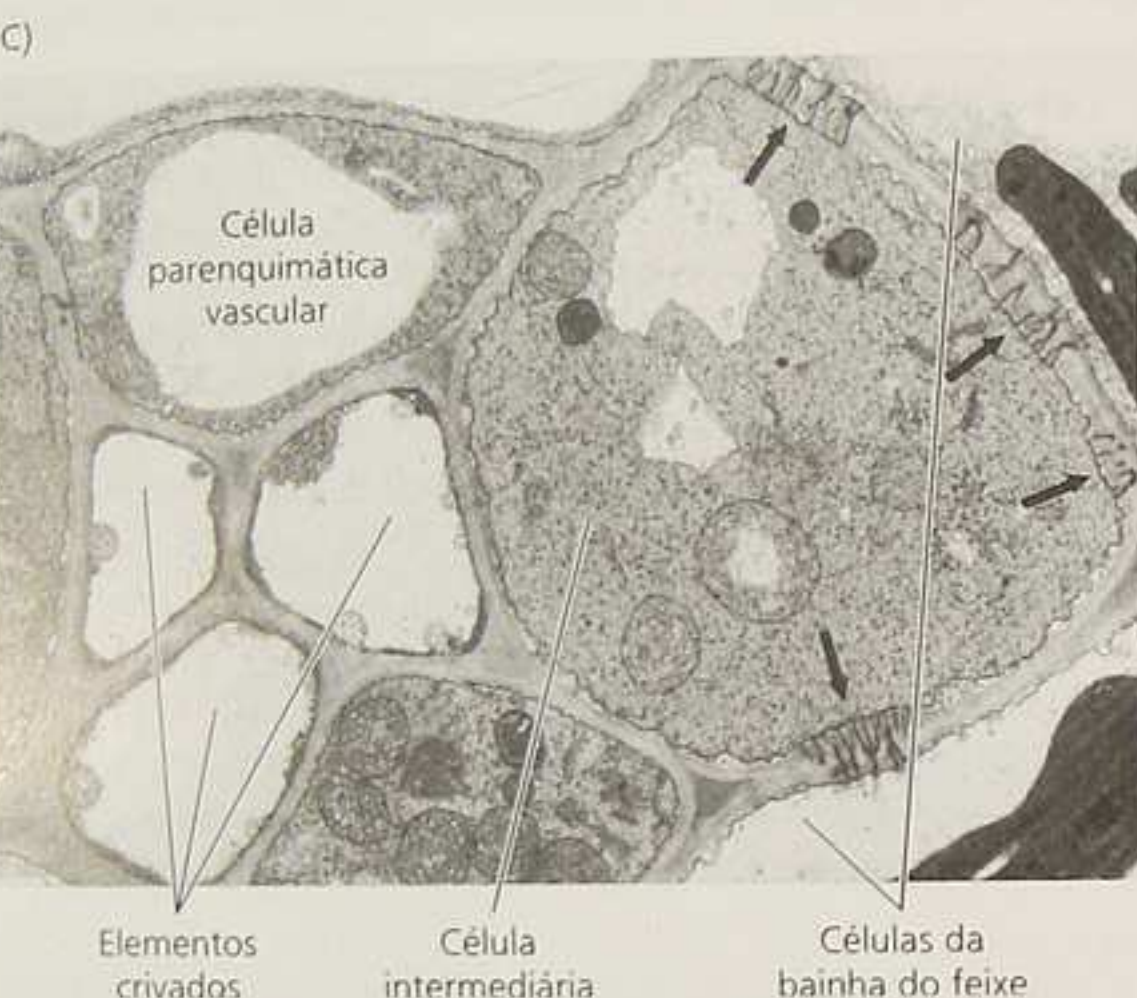
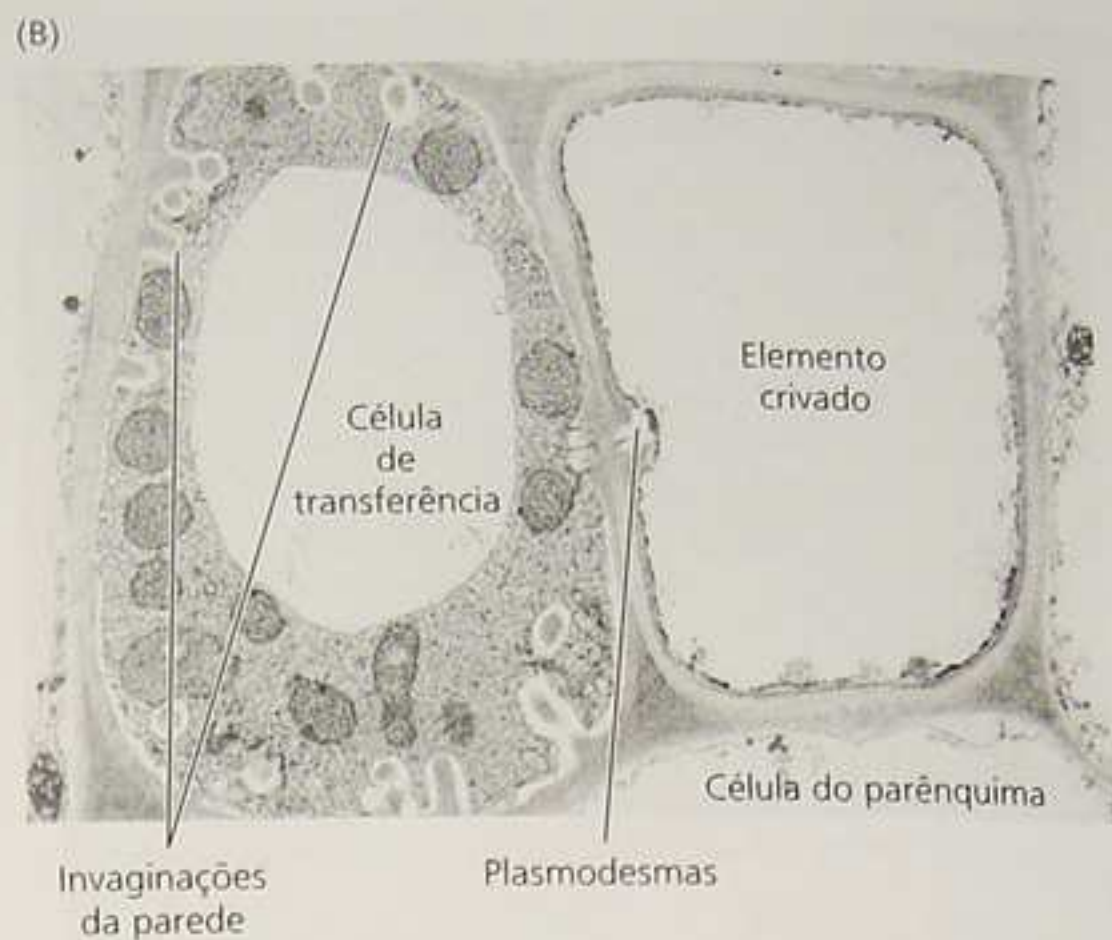
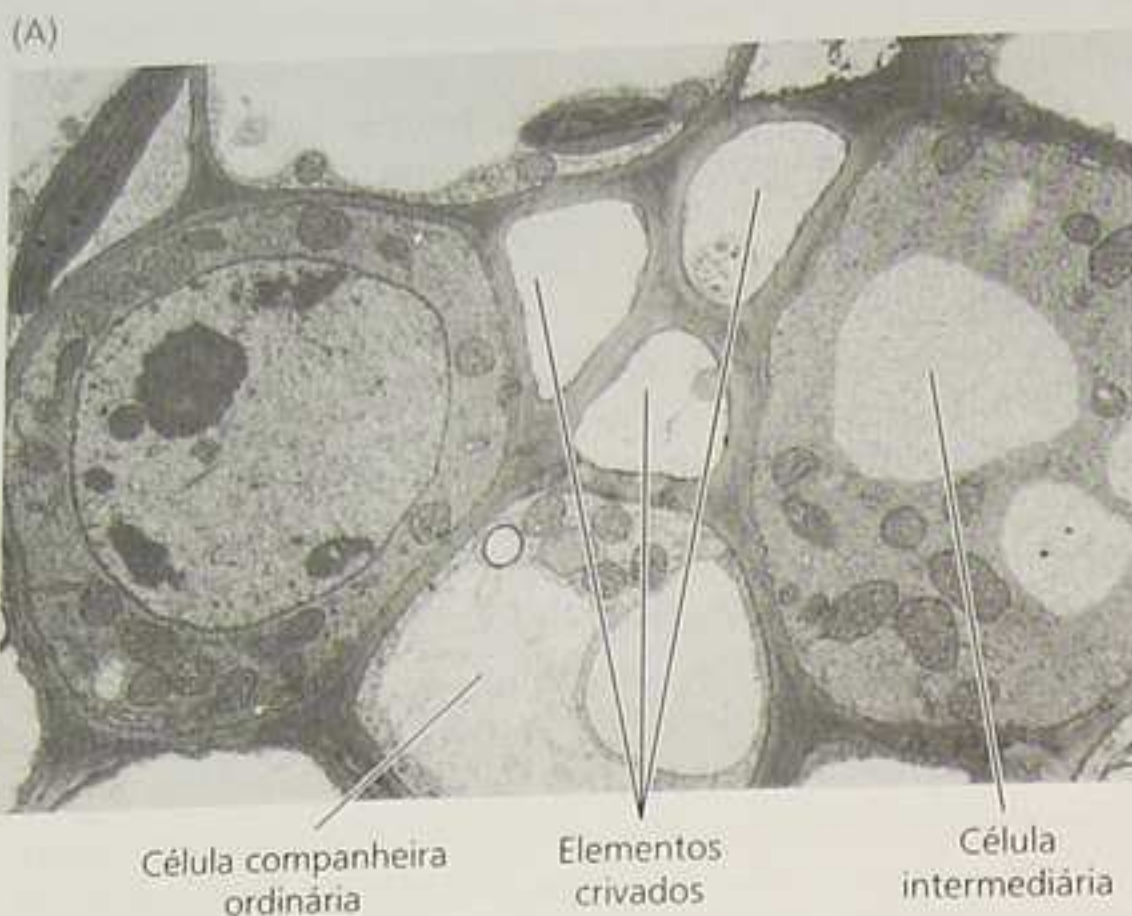



FIGURA 10.7 Electromicrografia das células companheiras nas nervuras de menor porte das folhas maduras. (A) Três elementos crivados contíguos a duas células intermediárias e uma célula companheira levemente corada em uma nervura menor de *Mimulus cardinalis*. (6.585x) (B) Um elemento crivado adjacente à célula de transferência com numerosas invaginações da parede em ervilha (*Pisum sativum*) (8.020x). Tais invaginações aumentam consideravelmente a superfície da membrana plasmática da célula de transferência, aumentando, assim, o transporte de materiais do mesofilo para o elemento crivado. (C) Uma célula intermediária típica com numerosos campos de plasmodesmas (setas) fazendo conexão com as células da bainha vascular adjacente. Esses plasmodesmas são ramificados em ambos os lados, mas as ramificações são maiores e mais estreitas no lado da célula intermediária. O floema das nervuras secundárias foi obtido da *Alonsoa warscewiczii* (4.700x) (A e C, de Turgeon e cols., 1993, gentilmente cedidas por R. Turgeon; B, de Brentwood 1978).

intermediárias atuam no transporte simplástico de açúcares das células do mesofilo aos elementos crivados, nas plantas onde parece não ocorrer a etapa apoplástica na folha fonte.

PADRÕES DE TRANSLOCAÇÃO: FONTE-DRENO

No floema, a seiva não é exclusivamente transportada na direção ascendente ou descendente e a translocação no floema não é definida em relação à gravidade. A seiva é, preferencialmente, translocada das áreas de produção, denominadas *fontes*, para as áreas de metabolismo ou armazenamento, chamadas de *drenos*.

As **fontes** incluem qualquer órgão exportador, tipicamente folhas maduras, que são capazes de produzir fotossintatos em excesso para suas necessidades. O termo *fotossintato* refere-se aos produtos da fotossíntese. Outro tipo de fonte é um órgão de reserva que exporta durante determinada fase do seu desenvolvimento. Por exemplo, a raiz da beterraba perene bianual (*Beta maritima*) é um dreno durante a estação de crescimento do primeiro ano, quando acumula açúcar proveniente das folhas-fonte. Durante a segunda estação de crescimento, a mesma raiz torna-se uma fonte; os açúcares são remobilizados e utilizados para produzir uma nova parte aérea, que, por fim, se torna reprodutiva.

É oportuno destacar que as variedades cultivadas de beterrabas têm sido selecionadas para que suas raízes atuem como drenos durante todas as fases do desenvolvimento. Assim, as raízes da beterraba cultivada (*Beta vulgaris*) podem aumentar em matéria seca durante a primeira e a segunda estações de crescimento, de modo que as folhas sirvam de fonte tanto durante o estádio de florescimento quanto o de frutificação.

Os **drenos** incluem órgãos não-fotossintéticos dos vegetais e órgãos que não produzem produtos fotossintéticos em quantidade suficiente para suas próprias necessidades de crescimento ou reserva. As raízes, os tubérculos, os frutos em desenvolvimento e as folhas imaturas, que devem importar carboidratos para seu desenvolvimento normal, são exemplos de tecidos-dreno. Estudos

de anelamento e de marcação radioativa dão suporte ao padrão de translocação fonte-dreno no floema.

As rotas fonte-dreno seguem padrões anatômicos e de desenvolvimento

Embora o padrão geral de transporte no floema possa ser dito simplesmente como um movimento fonte-dreno, as rotas específicas envolvidas são freqüentemente mais complexas. Nem todas as fontes suprem todos os drenos em uma planta; ao contrário, certas fontes suprem preferencialmente drenos específicos. No caso das plantas herbáceas, como beterraba e soja, por exemplo, podem ser feitas as seguintes generalizações.

Proximidade. A proximidade da fonte ao dreno é um fator significativo. As folhas maduras superiores na planta normalmente fornecem produtos fotossintéticos para o ápice em crescimento e para as folhas jovens imaturas. As folhas inferiores suprem predominantemente o sistema radicular. As intermediárias, por sua vez, exportam em ambas as direções, suprindo as folhas maduras entre as duas regiões.

Desenvolvimento. A importância de vários drenos pode ser alterada durante o desenvolvimento. Enquanto os ápices caulinares e radiculares são normalmente os drenos principais durante o crescimento vegetativo, os frutos, via de regra, tornam-se o dreno dominante durante o desenvolvimento reprodutivo, em particular para folhas adjacentes ou próximas.

Conexões vasculares. As folhas-fonte preferencialmente suprem os drenos com os quais elas possuem conexões vasculares diretas. No sistema de parte aérea, por exemplo, uma determinada folha está, em geral conectada a outras folhas abaixo ou acima no caule, por meio do sistema vascular. Tal linha vertical de folhas é chamada **ortóstico**. O número de entrenós no mesmo ortóstico varia com a espécie. A Figura 10.8A mostra a estrutura tridimensional do floema em um entrenó de dália (*Dhalia pinnata*).

Modificação das rotas de translocação. A interferência nas rotas de translocação provocada por ferimentos ou poda pode alterar os padrões estabelecidos por proximidade e conexões descritos aqui. Na ausência de conexões diretas entre a fonte e o dreno, interconexões vasculares, denominadas **anastomoses** (ver Figura 10.8A) podem representar uma via alternativa. Na beterraba, por exemplo, a remoção das folhas-fonte de um lado da planta pode causar uma transferência transversal de produtos fotossintéticos para as folhas jovens (folhas-dreno) no lado desbastado (ver Figura 10.8C). A remoção das folhas-fonte inferiores na planta pode

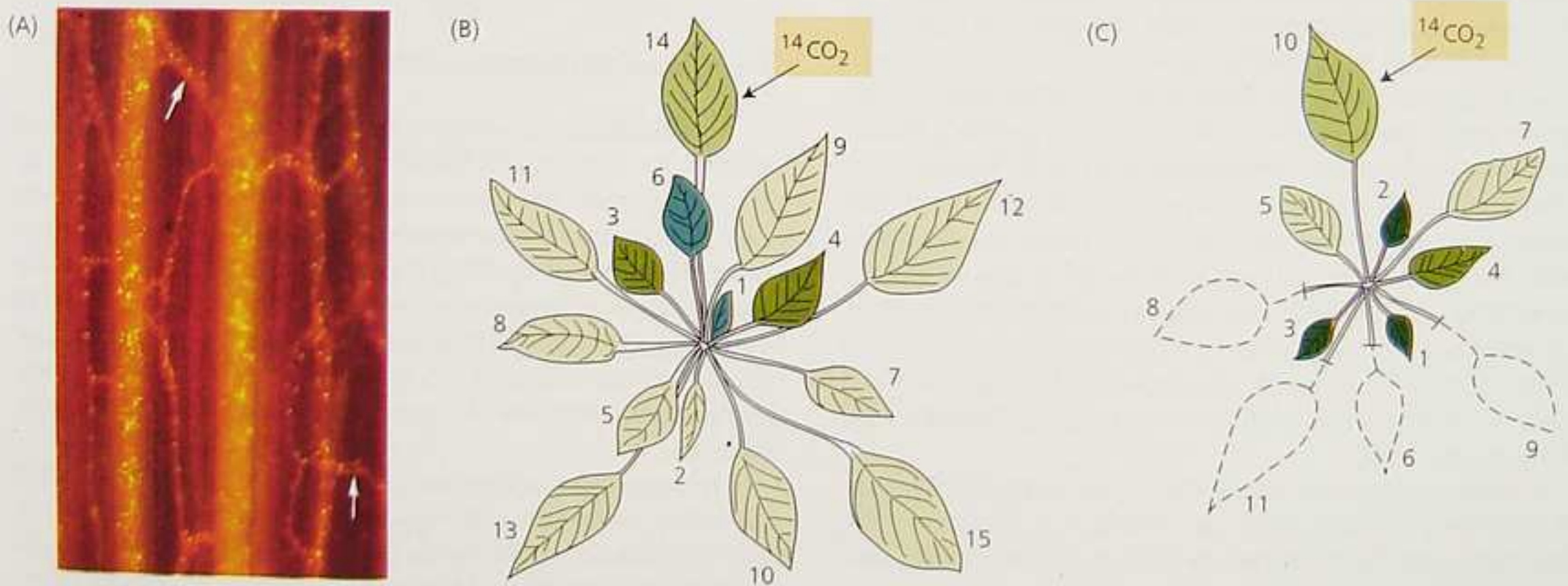



FIGURA 10.8 (A) Vista longitudinal de uma estrutura tridimensional no floema de uma seção espessa (de um entrenó de dália [*Dhalia pinnata*]). Aspecto após clareamento, coloração com azul de anilina e observação sob microscópio epifluorescente; as placas crivadas são vistas como numerosos pequenos pontos, devido à coloração amarela da calose nas áreas crivadas. Dois grandes feixes vasculares são proeminentes. Essa coloração revela os delicados tubos crivados formando a rede do floema; duas anastomoses do floema estão indicadas com setas. (B) Distribuição de radioatividade de uma única folha-fonte radioativa em uma planta intacta. A distribuição de radioatividade nas folhas da beterraba (*Beta vulgaris*) foi determinada uma semana após a aplicação de $^{14}CO_2$ por quatro horas a uma única folha-fonte (seta). O grau de marcação radioativa está indicado pela intensidade de sombreamento das folhas. As folhas são numeradas de acordo com sua idade; a mais jovem, recentemente desenvolvida, é designada 1. O ^{14}C foi translocado principalmente para as folhas-dreno diretamente acima da folha-fonte (i. é, folhas-dreno no mesmo ortóstico das folhas-fonte; por exemplo, folhas 1 e 6 são folhas-dreno diretamente acima da folha-fonte 14). (C) O mesmo B, com exceção de que todas as folhas-fonte no lado da planta oposto à folha marcada foram removidas 24 horas antes da marcação. As folhas em ambos os lados da planta agora recebem da fonte assimilados marcados com ^{14}C (A, gentilmente cedida por R. Aloni; B e C, baseados nos dados de Joy, 1964).

forçar as folhas-fonte superiores a translocar materiais para as raízes e a remoção das folhas superiores pode forçar as folhas inferiores a translocar materiais para a parte superior da planta.

A plasticidade da rota de translocação depende da extensão das conexões entre os feixes vasculares e das espécies e órgãos estudados. Em algumas espécies, as folhas em um ramo sem frutos não podem transportar fotossintatos para os frutos em um ramo adjacente desfolhado. Mas em outras plantas, como a soja (*Glycine max*), o fotossintato é transferido rapidamente de um lado onde os frutos foram em parte retirados para o lado parcialmente desfolhado.

TABELA 10.2
A composição da seiva do floema de mamona (*Ricinus communis*), coletada como exsudado de cortes no floema

Componente	Concentração (mg mL^{-1})
Açúcares	80,0–106,0
Aminoácidos	5,2
Ácidos orgânicos	2,0–3,2
Proteína	1,45–2,20
Potássio	2,3–4,4
Cloreto	0,355–0,675
Fosfato	0,350–0,550
Magnésio	0,109–0,122

Fonte: Hall e Backer, 1972.

MATERIAIS TRANSLOCADOS NO FLOEMA: SACAROSE, AMINOÁCIDOS, HORMÔNIOS E ALGUNS ÍONS INORGÂNICOS

A água é a substância mais abundante transportada no floema. Os solutos translocados, sobretudo carboidratos, estão dissolvidos em água (Tabela 10.2). A sacarose é o açúcar mais comumente transportado nos elementos crivados. Há sempre alguma sacarose na seiva do elemento crivado, podendo atingir concentrações de 0,3 a 0,9 *M*.

O nitrogênio é encontrado no floema, principalmente na forma de aminoácidos e amidas, em especial glutamato e aspartato e suas respectivas amidas, glutamina e asparagina. Os níveis de aminoácidos e ácidos orgânicos observados variam muito, até na mesma espécie, mas eles são em geral baixos quando comparados aos carboidratos.

Quase todos os hormônios endógenos das plantas, incluindo auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico (ver Capítulos 19, 20, 21 e 23) foram encontrados nos elementos crivados. Acredita-se que o transporte de longa distância de hormônios ocorra, pelo menos em parte, nos elementos crivados. Os nucleotídeos fosfato e as proteínas também são encontrados na seiva do floema.

As proteínas encontradas no floema incluem proteínas-P filamentosas (as quais estão envolvidas na obstrução dos elementos crivados danificados), as proteínas quinases (proteínas de fosforilação), a tioredoxina (redução dissulfídica), a ubiquitina (degradação de proteínas), as chaperonas (dobramento de proteínas) e os inibidores de protease (proteção das proteínas do floema contra a degradação e defesa contra os insetos sugadores) (Schobert e cols., 1995; Yoo e cols., 2000).

Os solutos inorgânicos que se movem no floema incluem potássio, magnésio, fosfato e cloreto (ver Tabela 10.2). Por outro lado, nitrato, cálcio, enxofre e ferro são relativamente imóveis no floema.

A discussão será iniciada sobre o conteúdo do floema, relacionando os métodos utilizados para identificar os materiais nele translocados. Examinar-se-ão, os açúcares translocados e a complexidade do transporte de nitrogênio na planta.

A seiva do floema pode ser coletada e analisada

A coleta da seiva do floema tem sido um desafio experimental (ver **Tópico 10.2 na Internet**). Poucas espécies exsudam seiva do floema a partir de ferimentos que rompem os elementos crivados, tornando possível coletar amostras relativamente puras da seiva. Uma outra abordagem é o uso do estilete de um afídio como uma "seringa natural".

Os afídios são pequenos insetos que se alimentam inserindo suas peças bucais, consistindo de quatro estiletes tubulares, em um único elemento crivado de uma folha ou caule. A seiva pode ser coletada dos estiletes cortados do corpo do inseto, normalmente com *laser*, após o afídio ter sido anestesiado com CO_2. A alta pressão de turgor no elemento crivado força os conteúdos celulares por meio do estilete até a extremidade cortada, onde podem ser coletados. Os exsudados dos estiletes cortados fornecem uma idéia razoavelmente precisa sobre a composição da seiva do floema (ver **Tópico 10.2 na Internet**). A exsudação em estiletes excisados pode continuar por horas, sugerindo que o afídio impede a ação do mecanismo normal de cicatrização dos elementos crivados.

Os açúcares são translocados na forma não-redutora

Os resultados das análises da seiva coletada indicam que os carboidratos translocados são em sua totalidade açúcares não-redutores. Açúcares redutores, como glicose e frutose, contêm um aldeído ou grupo cetona exposto (Figura 10.9A). Em um açúcar não-redutor, como a sacarose, o grupo cetona ou aldeído é reduzido a um álcool ou combinado com um grupo semelhante em outro açúcar (Figura 10.9B). A maioria dos pesquisadores acredita que os açúcares não-redutores são os principais compostos translocados no floema, pois eles são menos reativos que seus equivalentes redutores.

A sacarose é o açúcar mais comumente translocado; muitos dos outros carboidratos móveis contêm sacarose ligada a um número variado de moléculas de galactose. A rafinose consiste de sacarose e uma molécula de galactose, a estaquiose consiste de sacarose e duas moléculas de galactose e a verbascose consiste de sacarose e três moléculas de galactose (ver Figura 10.9B). Os açúcares-alcoóis translocados incluem manitol e sorbitol.

O floema e o xilema interagem para transportar compostos nitrogenados

O nitrogênio é transportado pela planta tanto na forma inorgânica quanto orgânica, e a predominância da forma depende de vários fatores, incluindo as rotas de transporte. Enquanto o nitrogênio é transportado no floema quase completamente na forma orgânica, no xilema ele pode ser conduzido como nitrato ou como parte de uma molécula orgânica (ver Capítulo 12). Normalmente,

(A) **Açúcares redutores, que não são normalmente translocados no floema**

Os grupos redutores são os grupos aldeídos (glicose ou manose) e os grupos cetona (frutose).

Aldeído — D-Glicose

Aldeído — D-Manose

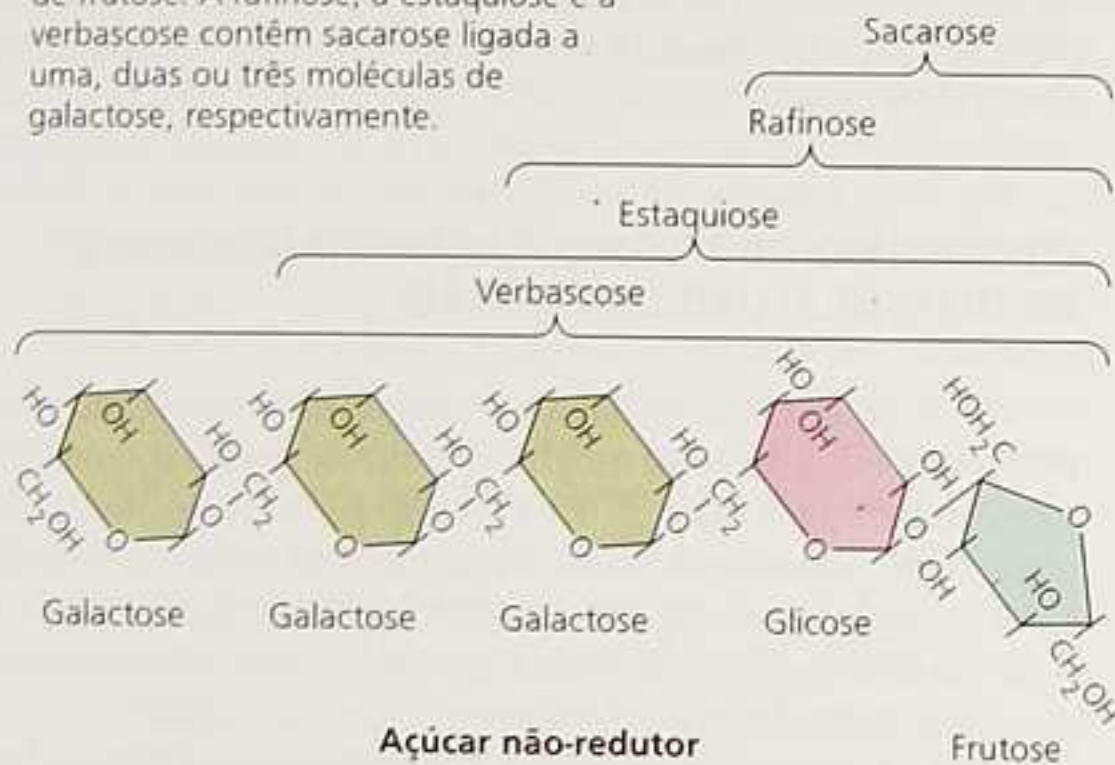
Cetona — D-Frutose

(B) **Compostos comumente translocados no floema**

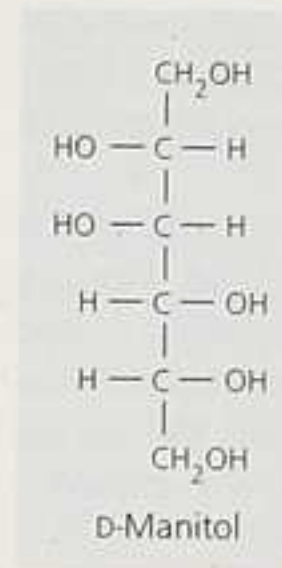
A sacarose é o dissacarídeo formado a partir de uma molécula de glicose e uma de frutose. A rafinose, a estaquiose e a verbascose contêm sacarose ligada a uma, duas ou três moléculas de galactose, respectivamente.

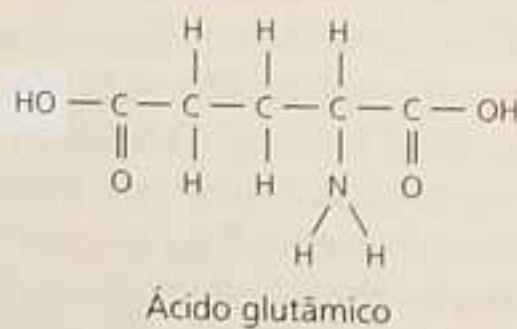
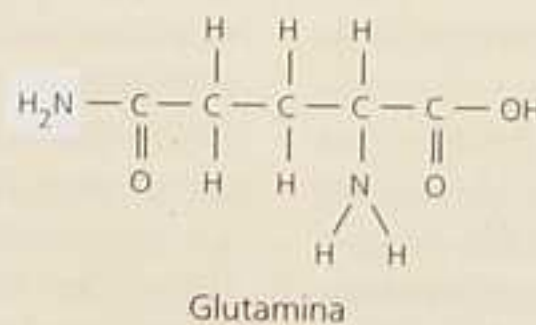
Sacarose, Rafinose, Estaquiose, Verbascose

Galactose, Galactose, Galactose, Glicose, Frutose

Açúcar não-redutor

Manitol é um açúcar-álcool formado da redução do grupo aldeído da manose.

D-Manitol

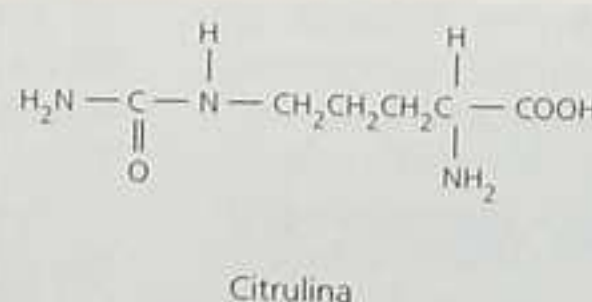
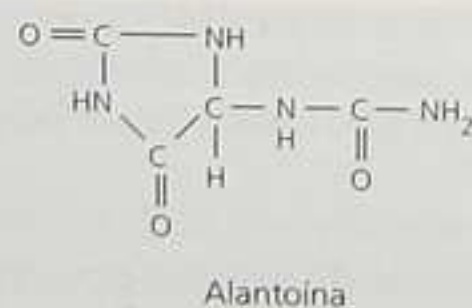
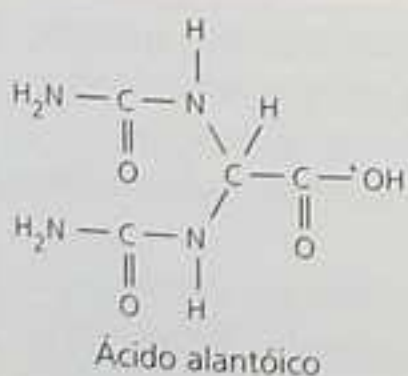
Açúcar-álcool

O ácido glutâmico, um aminoácido, e a glutamina, sua amida, são compostos nitrogenados importantes no floema, além do aspartato e da asparagina.

Ácido glutâmico — **Aminoácido**

Glutamina — **Amida**

Espécies com nódulos fixadores de nitrogênio também utilizam ureídas como formas de transporte de nitrogênio.

Ácido alantóico, Alantoína, Citrulina

Ureídas

FIGURA 10.9 Estrutura dos compostos que não são normalmente translocados no floema (A) e daqueles normalmente translocados (B).

o mesmo grupo de moléculas orgânicas transporta nitrogênio tanto no xilema quanto no floema.

A forma na qual o nitrogênio é transportado no xilema depende da espécie estudada. Espécies que não formam uma associação simbiótica com microrganismos fixadores de nitrogênio, via de regra, dependem do nitrato do solo como sua fonte principal de nitrogênio (ver Capítulo 12). No xilema dessas espécies, o nitrogênio normalmente está presente tanto na forma de nitrato quanto de moléculas ricas em nitrogênio, em particular as amidas asparagina e glutamina (ver Figura 10.9B).

As espécies com nódulos fixadores de nitrogênio em suas raízes (ver Capítulo 12) dependem mais do nitrogênio atmosférico que do nitrato do solo, como sua fonte principal de nitrogênio. Após ser convertido a uma forma orgânica, esse nitrogênio é transportado para a parte aérea pelo xilema, normalmente na forma de amidas ou ureídas como alantoína, ácido alantóico ou citrulina (ver Figura 10.9B).

Sempre que o nitrogênio é assimilado em compostos orgânicos nas raízes, tanto a energia quanto o esqueleto de carbono necessários para a assimilação são derivados dos fotossintatos transportados para as raízes pelo floema. Os níveis de nitrogênio nas folhas maduras são bastante estáveis, indicando que pelo menos parte do excesso de nitrogênio que chega continuamente, via xilema, é redistribuído pelo floema para os frutos ou folhas mais jovens (para informações no transporte de nitrogênio em soja, ver **Tópico 10.3 na Internet**).

Por fim, os níveis de compostos nitrogenados no floema são relativamente elevados durante a senescência foliar. Em espécies lenhosas, as folhas senescentes mobilizam e exportam compostos nitrogenados aos tecidos lenhosos para reserva; em plantas herbáceas, o nitrogênio vegetal é geralmente exportado para as sementes. Outros solutos, tais como íons minerais, são redistribuídos das folhas senescentes da mesma maneira.

TAXAS DE MOVIMENTO

A taxa de movimento de materiais nos elementos crivados pode ser expressa de duas maneiras: como **velocidade**, a distância linear percorrida por unidade de tempo, ou como **taxa de transferência de massa**, a quantidade de material que passa através de uma determinada seção transversal do floema ou dos elementos crivados por unidade de tempo. Tem sido dada preferência às taxas de transferência de massa baseadas na área de seção transversal dos elementos crivados, pois eles são as células condutoras do floema. Os valores das taxas de transferência de massa variam entre 1 a 15 g h^{-1} cm^{-2} de elementos crivados (ver **Tópico 10.4 na Internet**).

Nas primeiras publicações sobre as taxas de transporte no floema, as unidades de velocidade utilizadas eram centímetros por hora (cm h^{-1}) e as unidades de transferência de massa eram gramas por hora por centímetro quadrado (g h^{-1} cm^{-2}) no floema ou nos elementos crivados. As unidades atualmente utilizadas (unidades SI) são metros (m) ou milímetros (mm) para comprimento, segundos (s) para o tempo e quilogramas (kg) para massa.

As velocidades do transporte no floema superam a taxa de difusão

Tanto as velocidades quanto as taxas de transferência de massa podem ser medidas com marcadores radioativos (os métodos de medida de taxas de transferência de massa estão descritos no **Tópico 10.4 na Internet**). No tipo mais simples de experimento para medida de velocidade, o CO_2 marcado com C^{11} ou C^{14} é aplicado por um breve período de tempo à folha-fonte (pulso de marcação) e a chegada da marca radioativa no tecido-dreno ou a um ponto particular ao longo da rota é monitorada com um detector de radiação apropriado.

O comprimento da via de translocação dividido pelo intervalo de tempo necessário para que a marca radioativa seja detectada no dreno produz uma medida de velocidade. Uma medida mais precisa da velocidade é obtida a partir do monitoramento da radioatividade em dois pontos ao longo da rota. O método exclui da medida o tempo necessário para a fixação do carbono marcado pela fotossíntese, para sua incorporação no açúcar de transporte e para a acumulação de açúcar nos elementos crivados da folha-fonte.

Em geral, as velocidades medidas por várias técnicas são, em média, de 1m h^{-1} e variam de 0,3 a 1,5 m h^{-1} (30 a 150 cm h^{-1}). As velocidades de transporte no floema são bastante altas, muito além da taxa de difusão em grandes distâncias. Qualquer mecanismo proposto para translocação no floema deve levar em conta essas altas velocidades.

MECANISMO DE TRANSLOCAÇÃO NO FLOEMA: O MODELO DE FLUXO DE PRESSÃO

O mecanismo de translocação no floema em angiospermas pode ser explicado pelo modelo de fluxo de pressão, o qual leva em consideração a maioria dos dados experimentais e estruturais atualmente disponíveis. Nesta discussão será visto que o modelo de fluxo de pressão explica a translocação do floema como um fluxo de solução (fluxo de massa) governado por um gradiente de pressão gerado osmoticamente entre a fonte e o dreno.

Nas pesquisas iniciais sobre a translocação no floema, tanto os mecanismos ativos quanto os passivos foram considerados. Todas as teorias, ativas e passivas, supõem uma necessidade de energia tanto na fonte quanto no dreno. Nas fontes, a energia é necessária para mover o fotossintato das células produtoras para os elementos crivados. Este movimento do fotossintato é denominado *carregamento do floema* e será discutido mais adiante neste capítulo. Nos drenos, a energia é essencial para alguns aspectos do movimento dos elementos crivados para as células-dreno, as quais armazenam ou metabolizam o açúcar. Esse movimento do fotossintato dos elementos crivados para as células-dreno é chamado de *descarregamento do floema* e também será discutido posteriormente.

Os mecanismos passivos do transporte no floema supõem ainda que a energia é necessária nos elementos de tubo crivado da rota entre as fontes e os drenos simplesmente para manter estruturas como membrana plasmática celular e recuperar açúcares que vazaram do floema. O modelo de fluxo de pressão é um exemplo de um mecanismo passivo. As teorias ativas, por outro lado, postulam um gasto adicional de energia pelos elementos de tubo crivado da rota, para acionar a translocação (Zimmermann e Milburn, 1975).

Um gradiente de pressão governa a translocação

A difusão é um processo muito lento para ser responsável pelas velocidades de movimento de solutos observadas no floema.

As velocidades de translocação são, em média, de 1 m h^{-1}; a taxa de difusão é de 1 m em 32 anos! (ver Capítulo 3, para uma discussão sobre as velocidades de difusão e as distâncias nas quais a difusão representa um mecanismo efetivo de transporte).

O **modelo de fluxo de pressão,** inicialmente proposto por Ernst Münch, em 1930, defende que um fluxo de solução nos elementos crivados é acionado por um *gradiente de pressão* gerado osmoticamente entre a fonte e o dreno ($\Delta \Psi_p$). O gradiente de pressão é estabelecido como uma conseqüência do carregamento do floema na fonte e o descarregamento no dreno.

Lembre-se do Capítulo 3 (Equação 3.6), em que $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$; isto é, $\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$. Nos tecidos-fonte, o carregamento do floema acionado por energia leva a um acúmulo de açúcares nos elementos crivados, gerando um potencial de soluto baixo (negativo) ($\Delta \Psi_s$), causando uma queda acentuada no potencial hídrico ($\Delta \Psi_w$). Em resposta ao gradiente de potencial hídrico, a água entra nos elementos crivados e causa o aumento da pressão de turgor (Ψ_p).

Na extremidade receptora da rota de translocação, o descarregamento do floema leva a uma menor concentração de açúcar nos elementos crivados, gerando um potencial de soluto mais alto (mais positivo) dos elementos crivados dos tecidos-dreno. Como o potencial hídrico do floema aumenta acima daquele do xilema, a água tende a deixar o floema em resposta ao gradiente de potencial hídrico, provocando um decréscimo na pressão de turgor nos elementos crivados do dreno. A Figura 10.10 ilustra a hipótese do fluxo de pressão.

Se não houvesse paredes transversais na rota de translocação — isto é, se toda a rota fosse um compartimento revestido por uma única membrana — as diferentes pressões entre a fonte e o dreno seriam rapidamente equilibradas. A presença de placas crivadas aumenta consideravelmente a resistência ao longo da rota e resulta na geração e na manutenção de um gradiente substancial de pressão entre a fonte e o dreno. O conteúdo dos elementos crivados é fisicamente empurrado ao longo da rota de translocação como um fluxo de massa, semelhante à água fluindo por uma mangueira de jardim.

Um exame cauteloso dos valores de potencial hídrico indicados na Figura 10.10 mostra que *a água no floema é movida contra um potencial hídrico da fonte para o dreno*. Tal movimento da água não transgride as leis da termodinâmica, pois a água move-se mais por fluxo de massa do que por osmose. Assim, nenhuma membrana é transposta durante o transporte de um tubo crivado para outro e os solutos movem-se na mesma velocidade das moléculas de água.

Sob tais condições, o potencial do soluto, Ψ_s, não pode contribuir para a força motriz do movimento da água, embora influencie o potencial hídrico. O movimento da água na rota de translocação é, portanto, impulsionado mais pelo gradiente de pressão que pelo de potencial hídrico. Naturalmente, a translocação passiva, impulsionada por pressão e a longas distâncias nos tubos crivados depende, em última instância, dos mecanismos de transporte ativos e de curta distância envolvidos no carregamento e descarregamento do floema. Tais mecanismos ativos são responsáveis pelo estabelecimento do gradiente de pressão.

As previsões do modelo de fluxo de pressão têm sido confirmadas

Algumas suposições importantes surgem a partir do modelo de fluxo de pressão:

- Os poros da placa crivada devem estar desobstruídos. Se a proteína-P ou outros materiais obstruíssem os poros, a resistência ao fluxo da seiva do elemento crivado poderia ser muito grande.
- O *transporte bidirecional* (i. é, transporte simultâneo em ambas direções) em um elemento crivado não pode ocorrer. Um fluxo de massa de solução impede tal movimento bidirecional, pois uma solução pode fluir em apenas uma direção em um tubo em um determinado tempo. Os solutos no floema podem mover-se bidirecionalmente, mas em diferentes elementos crivados ou em tempos diferentes.
- Grandes gastos de energia não são necessários para impulsionar a translocação nos tecidos ao longo da via, embora seja necessário haver energia para manter a estrutura dos elementos crivados e recarregar açúcares perdidos para o apoplasto por vazamento. Por essa razão, tratamentos que restringem o suprimento de ATP na rota, como baixa temperatura, anoxia e inibidores metabólicos, não deveriam parar a translocação.
- A hipótese de fluxo de pressão demanda a presença de um gradiente de pressão positivo. A pressão de turgor deve ser mais alta nos elementos crivados das fontes que nos elementos dos drenos e a diferença de pressão deve ser grande o suficiente para sobrepor a resistência da rota e manter o fluxo nas velocidades observadas.

As evidências disponíveis quanto à avaliação dessas suposições sustentam a hipótese de fluxo de pressão.

Os poros das placas crivadas são canais abertos

Os estudos ultra-estruturais dos elementos crivados são desafiadores devido à alta pressão interna dessas células. Quando o floema é cortado ou destruído lentamente com fixadores químicos, a pressão de turgor nos elementos crivados é diminuída. Os conteúdos da célula, incluindo a proteína-P, movem-se em direção ao ponto de menor pressão e, no caso dos elementos de tubo crivado, acumulam-se nas placas crivadas. Esse acúmulo é provavelmente a razão pela qual muitas das electromicrografias mais antigas mostram placas obstruídas.

Mais recentemente, técnicas de congelamento rápido e de fixação fornecem imagens confiáveis de elementos crivados inalterados. Electromicrografias dos elementos de tubo crivado preparados por essas técnicas mostram que a proteína-P é normalmente encontrada ao longo da periferia dos elementos de tubo crivado (ver Figuras 10.3, 10.4 e 10.5) ou está uniformemente distribuída através do lume da célula. Além disso, os poros contêm proteína-P em posições semelhantes, revestindo o poro ou formando uma rede frouxa. A condição de poros não-obstruídos, observada em espécies como abóbora, beterraba e feijão (p. ex., ver Figura 10.5), dá suporte ao modelo de fluxo de pressão.

Além de obter evidências estruturais fornecidas pela microscopia eletrônica, é importante determinar se os poros das placas crivadas estão abertos no tecido intacto. O uso da microscopia confocal, que permite a observação direta da translocação através de elementos crivados vivos, trata desta questão (Knoblauch e van Bel, 1998). Tais experimentos mostram que os poros das placas crivadas dos elementos crivados vivos, que realizam translocação, estão abertos (Figura 10.11).

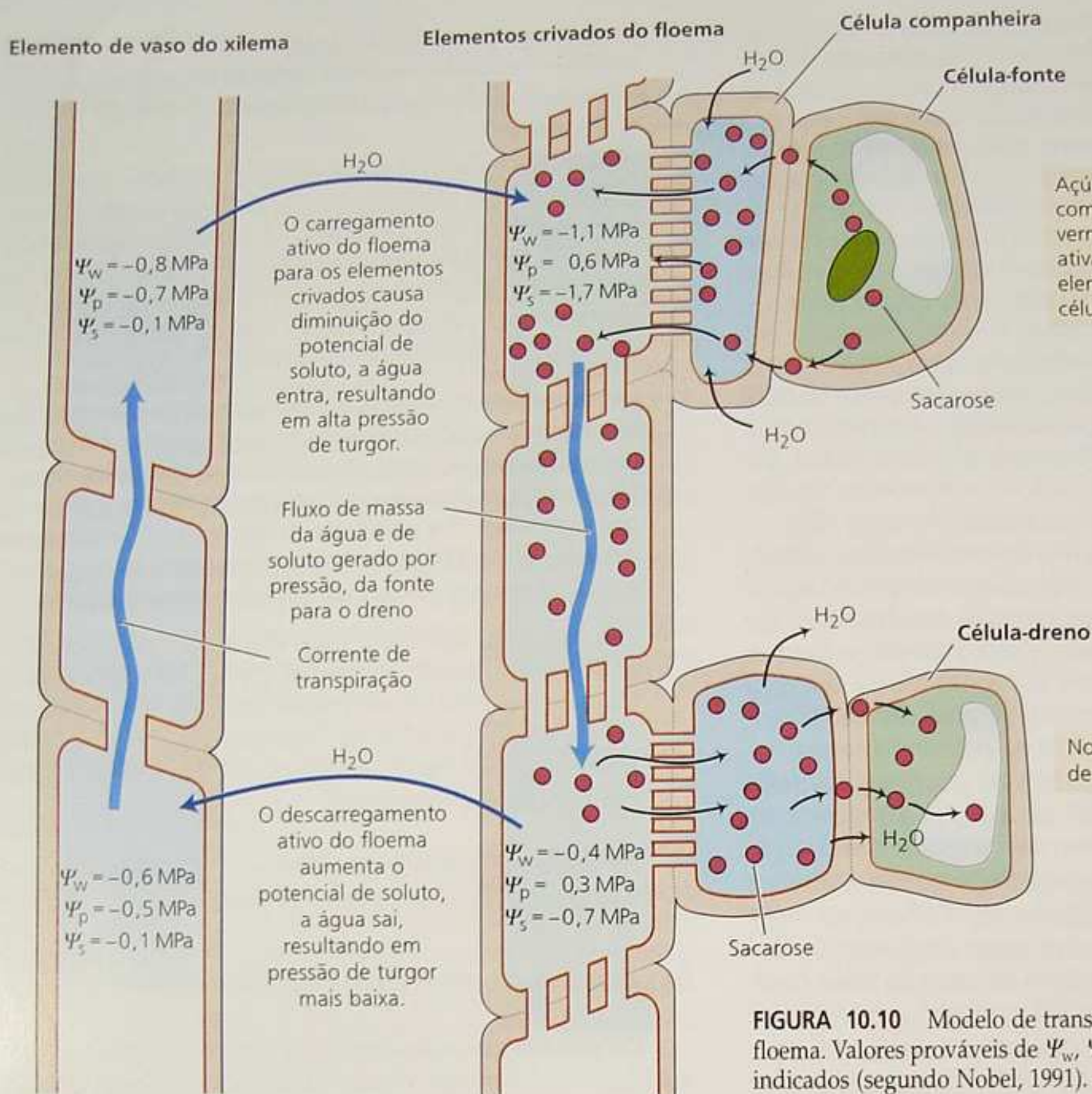



FIGURA 10.10 Modelo de translocação por fluxo de pressão no floema. Valores prováveis de Ψ_w, Ψ_p e Ψ_s no xilema e no floema estão indicados (segundo Nobel, 1991).

O transporte bidirecional não pode ser visualizado em um único elemento crivado

Os pesquisadores têm investigado o transporte bidirecional por meio da aplicação de dois marcadores radioativos diferentes em duas folhas-fonte, uma acima da outra (Eschrich, 1975). Cada folha recebe um dos marcadores e um ponto entre as duas fontes é monitorado para a presença de ambos marcadores.

O transporte nas duas direções tem sido detectado com freqüência em elementos crivados de diferentes feixes vasculares nos caules. O transporte em duas direções também foi detectado nos elementos crivados adjacentes do mesmo feixe em pecíolos. O transporte bidirecional em elementos crivados adjacentes pode ocorrer em pecíolos de uma folha que está em transição entre dreno e fonte e está simultaneamente importando e exportando fotossintatos através do seu pecíolo. No entanto, o transporte bidirecional em um único elemento crivado nunca foi demonstrado.

A taxa de translocação é tipicamente insensível ao suprimento de energia dos tecidos da rota

Nas plantas que sobrevivem a períodos de baixa temperatura, como a beterraba, por exemplo, o rápido resfriamento de um segmento do pecíolo de uma folha-fonte a até, aproximadamente, 1°C não causa inibição contínua do transporte de massa para fora da folha (Figura 10.12). Mais propriamente, há um breve período de inibição, após o qual o transporte retorna lentamente à velocidade controle. O resfriamento reduz, em cerca de 90%, a taxa de respiração, bem como a síntese e o consumo de ATP no pecíolo, ao mesmo tempo em que a translocação é recuperada e prossegue normalmente. Tais experimentos demonstram que a necessidade de energia para o transporte através do floema dessas plantas é pequena, consistente com a hipótese do fluxo de pressão.

Os tratamentos extremos que inibem todo o metabolismo energético inibem também a translocação. Por exemplo, em feijoeiro

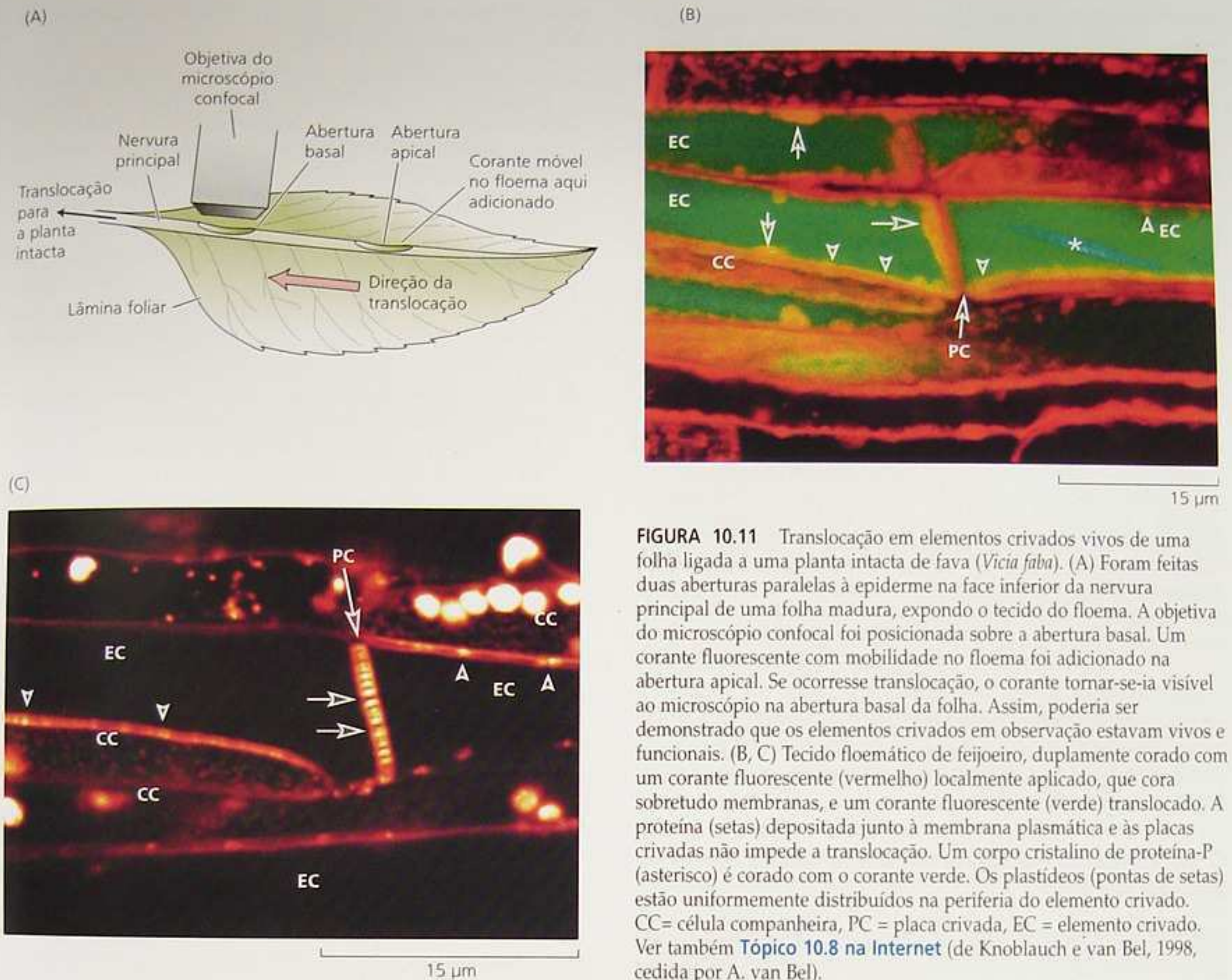



FIGURA 10.11 Translocação em elementos crivados vivos de uma folha ligada a uma planta intacta de fava (*Vicia faba*). (A) Foram feitas duas aberturas paralelas à epiderme na face inferior da nervura principal de uma folha madura, expondo o tecido do floema. A objetiva do microscópio confocal foi posicionada sobre a abertura basal. Um corante fluorescente com mobilidade no floema foi adicionado na abertura apical. Se ocorresse translocação, o corante tornar-se-ia visível ao microscópio na abertura basal da folha. Assim, poderia ser demonstrado que os elementos crivados em observação estavam vivos e funcionais. (B, C) Tecido floemático de feijoeiro, duplamente corado com um corante fluorescente (vermelho) localmente aplicado, que cora sobretudo membranas, e um corante fluorescente (verde) translocado. A proteína (setas) depositada junto à membrana plasmática e às placas crivadas não impede a translocação. Um corpo cristalino de proteína-P (asterisco) é corado com o corante verde. Os plastídeos (pontas de setas) estão uniformemente distribuídos na periferia do elemento crivado. CC= célula companheira, PC = placa crivada, EC = elemento crivado. Ver também **Tópico 10.8 na Internet** (de Knoblauch e van Bel, 1998, cedida por A. van Bel).

(*Phaseolus vulgaris*), tratando o pecíolo de uma folha-fonte com um inibidor metabólico (cianeto), ocorre a inibição da translocação para fora da folha. No entanto, o exame, por meio de microscopia eletrônica, do tecido tratado revela um bloqueio nos poros das placas crivadas por fragmentos celulares (Giaquinta e Geiger, 1977). Obviamente, esses resultados não dão suporte à questão da necessidade de energia para a translocação ao longo da rota.

Os gradientes de pressão são suficientes para induzir o fluxo de massa da solução

A pressão de turgor nos elementos crivados pode ser calculada tanto diretamente quanto a partir do potencial hídrico e do potencial de soluto ($\Psi_p = \Psi_w - \Psi_s$). A técnica mais efetiva utiliza micromanômetros ou transdutores de pressão ligados aos estiletes de afídios contendo os exsudados (ver Figura 10.2A no **Tópico 10.2 na Internet**) (Wright e Fisher, 1980). Os dados obtidos são precisos, pois os afídios perfuram um único elemento crivado e a membrana plasmática aparentemente veda ao redor do estilete do inseto. Quando a pressão de turgor do elemento crivado é medida com o uso desta técnica, a pressão na fonte é mais alta do que no dreno.

Em soja, a diferença de pressão observada entre a fonte e o dreno foi demonstrada ser suficiente para induzir o fluxo de massa da solução através da rota, considerando a resistência (causada sobretudo pelos poros da placa crivada), a extensão da rota e a velocidade da translocação (Fisher, 1978). A diferença real de pressão entre a fonte e o dreno foi determinada a partir dos potenciais hídricos e de soluto como sendo 0,4 MPa, e a diferença de pressão necessária para a translocação por fluxo de pressão foi de 0,12 a 0,46 MPa. Assim, a diferença de pressão observada parece ser suficiente para acionar o fluxo de massa pelo floema.

Pode-se, portanto, concluir que todos os experimentos e dados descritos aqui sustentam o funcionamento do fluxo de pressão no floema das angiospermas. A ausência de uma demanda energética na rota e a presença de poros abertos das placas crivadas fornecem evidências definitivas para um mecanismo no qual a

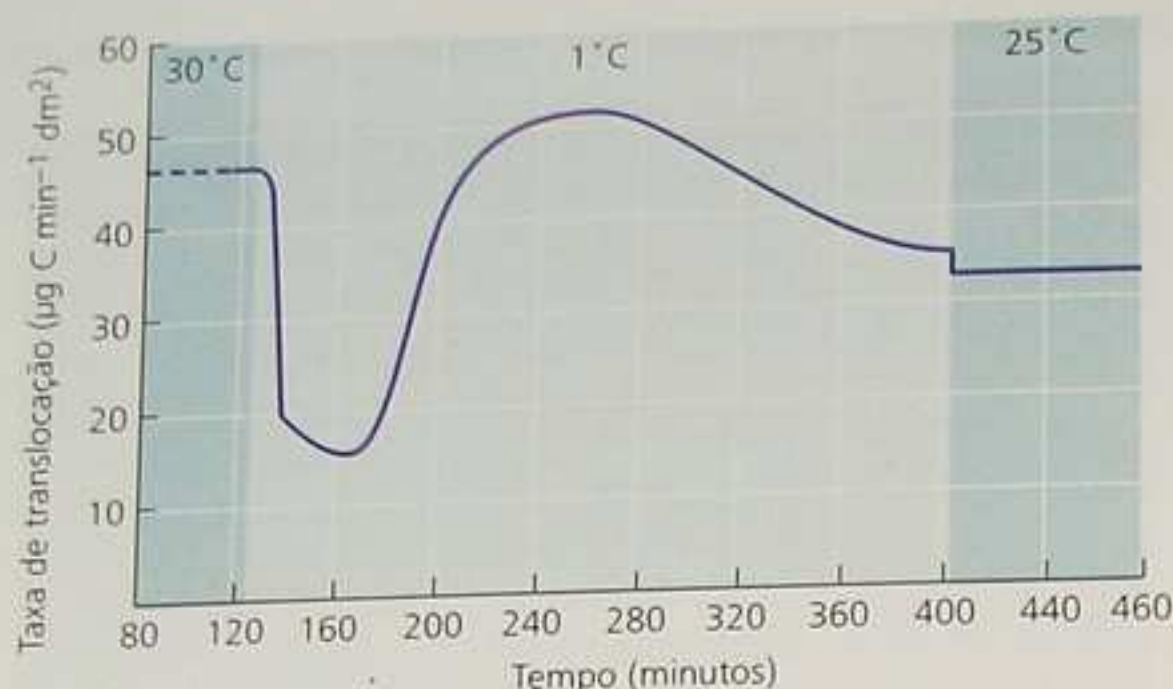



FIGURA 10.12 A perda de energia metabólica resultante do resfriamento do pecíolo da folha reduz parcialmente a taxa de translocação em beterraba (*Beta vulgaris*), embora essa taxa seja recuperada com o tempo. O fato da translocação ser recuperada, quando a produção e a utilização de ATP são amplamente inibidas por resfriamento, indica que a necessidade de energia para a translocação é pequena. CO_2 marcado com C^{14} foi fornecido a uma folha-fonte e um segmento de 2 cm do seu pecíolo foi resfriado a 1°C. A translocação foi monitorada pela chegada do C^{14} à folha-dreno (dm [decímetro] = 0,1 m) (Geiger e Sovonick, 1975).

rota do floema é relativamente passiva. A não-detecção do transporte bidirecional ou da mobilidade de proteínas, bem como os dados positivos de gradientes de pressão, estão de acordo com a hipótese do fluxo de pressão.

O mecanismo do transporte no floema de gimnospermas pode ser diferente

Embora o fluxo de pressão explique a translocação em angiospermas, ele pode não ser adequado para gimnospermas. Pouca informação sobre a fisiologia do floema das gimnospermas está disponível e a especulação sobre a translocação nessas espécies está baseada, quase que completamente, na interpretação de electromicrografias. Conforme já foi discutido, as células crivadas das gimnospermas são similares em muitos aspectos aos elementos de tubo crivado das angiospermas, mas as áreas crivadas das células crivadas são relativamente pouco especializadas e parecem não apresentar poros abertos (ver Figura 10.6).

Nas gimnospermas, os poros são preenchidos com numerosas membranas contínuas com o retículo endoplasmático liso adjacente às áreas crivadas. Tais poros são completamente inconsistentes com as exigências da hipótese de fluxo de pressão. Embora tais electromicrografias possam ser um artefato e não mostrem as condições do tecido intacto, a translocação em gimnospermas poderia envolver um mecanismo diferente — uma possibilidade que requer investigação adicional.

CARREGAMENTO DO FLOEMA: DOS CLOROPLASTOS AOS ELEMENTOS CRIVADOS

Várias etapas de transporte estão envolvidas no movimento de fotossintatos dos cloroplastos do mesofilo até os elementos crivados das folhas maduras, o que é denominado **carregamento do floema** (Oparka e van Bel, 1992):

1. A triose fosfato formada pela fotossíntese durante o dia (ver Capítulo 8) é transportada do cloroplasto para o citosol, onde é convertida à sacarose. Durante a noite, o carbono do amido armazenado deixa o cloroplasto, provavelmente na forma de glicose, sendo convertido à sacarose (outros açúcares de transporte são posteriormente sintetizados a partir da sacarose em algumas espécies).
2. A sacarose move-se da célula do mesofilo para os elementos crivados adjacentes das nervuras menores da folha (Figura 10.13). Esta rota de **transporte de curta distância** normalmente cobre uma distância do diâmetro de apenas duas ou três células.
3. Em um processo denominado **carregamento do elemento crivado**, os açúcares são transportados para os elementos crivados e células companheiras. Na maioria das espécies estudadas até agora, os açúcares concentram-se mais nos elementos crivados e nas células companheiras do que no mesofilo. Observe que, com relação ao carregamento, os elementos crivados e as células companheiras são muitas vezes considerados como uma unidade funcional, denominada *complexo elemento crivado célula companheira*. Uma vez dentro dos elementos crivados, a sacarose e outros solutos são translocados para longe da fonte, um processo denominado **exportação**. A translocação por meio do sistema vascular para o dreno é referida como **transporte de longa distância**.

Conforme já discutido anteriormente, os processos de carregamento na fonte e descarregamento no dreno representam a força motriz que gera o gradiente de pressão, impulsionando a seiva do floema no transporte de longa distância e, assim, são importantes como conhecimento básico e agronômico. O completo entendimento desses mecanismos deveria fornecer as bases da tecnologia utilizada para intensificar a produtividade de plantas cultivadas, pelo aumento do acúmulo de fotossintatos nos tecidos-dreno comestíveis, como os grãos dos cereais.

Os fotossintatos podem se mover das células do mesofilo para os elementos crivados através do apoplasto ou do simplasto

Foi visto que os solutos (principalmente os açúcares) das folhas-fonte devem se mover das células fotossintetizantes do mesofilo para as nervuras. Os açúcares poderiam se mover completamente por meio do simplasto (citoplasma) via plasmodesmas ou poderiam passar para o apoplasto em determinado ponto da rota do floema (Figura 10.14) (para uma descrição geral do simplasto e do apoplasto, ver Figura 4.3). No último caso, os açúcares são ativamente carregados do apoplasto para os elementos crivados e células companheiras por um transportador seletivo e acionado por energia, localizado nas membranas plasmáticas dessas células. De fato, as rotas apoplásticas e simplásticas são utilizadas em diferentes espécies.

As pesquisas iniciais sobre o carregamento do floema enfocaram a via apoplástica. O carregamento apoplástico do floema leva a três suposições (Grusak e cols., 1996): (1) os açúcares transportados deveriam ser encontrados no apoplasto; (2) em experimentos nos quais os açúcares são aplicados ao apoplasto, os açúcares exó-

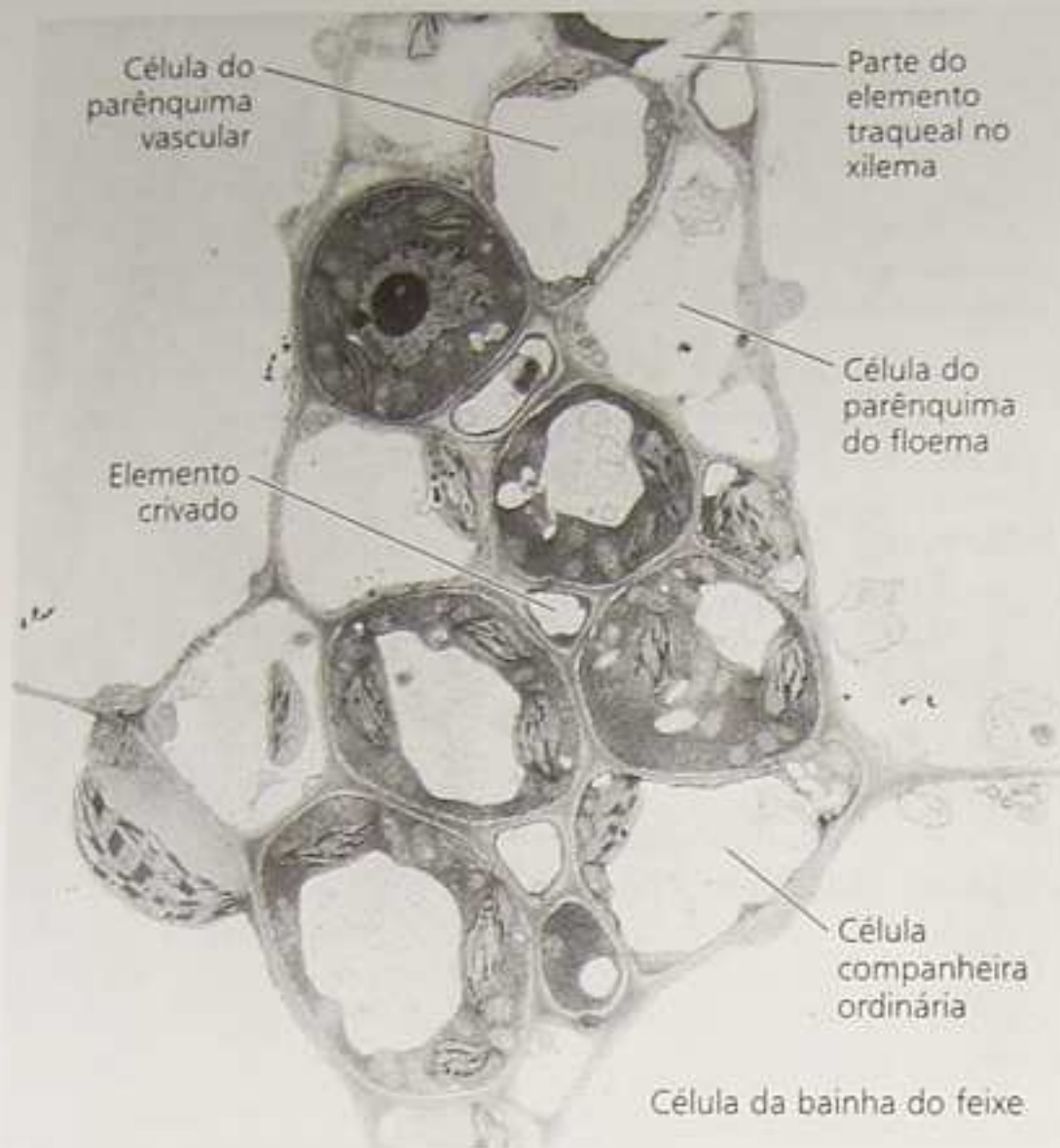



FIGURA 10.13 Electromicrografia mostrando a relação entre os vários tipos de células de uma nervura de menor porte de uma folha-fonte de beterraba (*Beta vulgaris*). As células fotossintéticas (células do mesofilo) circundam a camada de células compactamente organizadas da bainha vascular. Os fotossintatos do mesofilo devem se deslocar uma distância equivalente a vários diâmetros celulares, antes de serem carregados nos elementos crivados (Evert e Mierzwa, 1985, cedida por R. Evert).

genos fornecidos deveriam se acumular nos elementos crivados e nas células companheiras; e (3) a inibição da absorção do açúcar do apoplasto deveria resultar na inibição da exportação pela folha. Muitos estudos dedicados a testar essas previsões têm fornecido evidências consistentes para o carregamento apoplástico em várias espécies (ver **Tópico 10.5 na Internet**).

A absorção de sacarose na rota apoplástica requer energia metabólica

Nas folhas-fonte, os açúcares estão mais concentrados nos elementos crivados e nas células companheiras do que no mesofilo. Essa diferença na concentração do soluto, encontrada na maioria das espécies estudadas, pode ser demonstrada através da medida do potencial osmótico (Ψ_s) de vários tipos celulares da folha (ver Capítulo 3).

Em beterraba, o potencial osmótico do mesofilo é aproximadamente –1,3 MPa e o potencial osmótico dos elementos crivados e células companheiras é cerca de –3,0 MPa (Geiger e cols., 1973). Acredita-se que a maior parte dessa diferença é resultado do açúcar acumulado, especificamente sacarose, pelo fato de este ser o principal açúcar transportado na espécie. Os estudos experimentais têm demonstrado que tanto a sacarose fornecida externamente quando a sacarose produzida a partir dos produtos fotossintéticos acumulam-se nos elementos crivados e células companheiras das nervuras menores das folhas-fonte de beterraba (Figura 10.15).

O fato de a sacarose estar em concentração mais alta no complexo elemento crivado-célula companheira do que nas células adjacentes indica que este açúcar é ativamente transportado contra seu gradiente de potencial químico. A dependência do acúmulo de sacarose pelo transporte ativo é baseada no fato de que o tratamento do tecido-fonte com inibidores respiratórios leva ao decréscimo na concentração de ATP e inibe o carregamento do açúcar exógeno. Por outro lado, outros metabólitos, como ácidos orgânicos e hormônios, podem entrar passivamente nos elementos crivados (ver **Tópico 10.6 na Internet**).

Na rota apoplástica, o carregamento dos elementos crivados envolve um transportador de sacarose-H$^+$ do tipo simporte

Um transportador de sacarose-H$^+$ do tipo simporte (do inglês, *sucrose-H$^+$ symporter*) parece ser o mediador do transporte de sacarose do apoplasto para o complexo elemento crivado-célula companheira. Recorde, do Capítulo 6, que o simporte é um processo de transporte que utiliza a energia gerada por uma bomba de prótons (ver Figura 6.10A). A energia dissipada pelos prótons no movimento de retorno para a célula é usada para absorver um substrato, neste caso a sacarose (ver Figura 10.16).

O pH alto (baixa concentração de H$^+$) no apoplasto reduz a absorção da sacarose exógena pelos elementos crivados e células companheiras de fava. Isto ocorre porque uma baixa concentração de prótons no apoplasto reduz a força motriz para a difusão de prótons no simplasto e para o transportador de sacarose-H$^+$ do tipo simporte.

Dados de estudos moleculares apóiam o funcionamento de um transportador de sacarose-H$^+$ do tipo simporte no carregamento do elemento crivado. As ATPases de bombeamento de prótons, localizadas por técnicas de imunologia, foram encontradas tanto nas membranas plasmáticas das células companheiras de *Arabidopsis* quanto nas células de transferência de fava. Nas células de transferência, as moléculas de H$^+$-ATPases estão mais concentradas nos dobramentos da membrana plasmática voltados para as células da bainha do feixe e do parênquima do floema (para detalhes, ver **Tópico 10.7 na Internet**).

Tal localização sugere que a função destas H$^+$-ATPases é fornecer energia para o transporte de fotossintatos do apoplasto para os elementos crivados (Bouche-Pillon e cols., 1994). Além disso, a distribuição de H$^+$-ATPases nas células companheiras de *Arabidopsis* parece estar relacionada com a distribuição de um transportador de sacarose-H$^+$ do tipo simporte chamado *SUC2* (DeWitt e Sussman, 1995; Truernit e Sauer, 1995). O transportador SUC2 também foi localizado nas células companheiras da tansagem, *Plantago major* (ver **Tópico 10.7 na Internet**). As H$^+$-ATPases e os transportadores de sacarose-H$^+$ do tipo simporte estão preferencialmente co-localizados nas membranas plasmáticas dos elementos crivados (Langhans e cols., 2001) do que nas células companheiras.

O SUC2 é um dos vários transportadores de sacarose-H$^+$ do tipo simporte que têm sido clonados e localizados no floema (Tabela 10.3). Os carregadores são encontrados nas membranas plasmáticas dos elementos crivados (SUT1, SUT2 e SUT4) ou nas células companheiras (SUC2). O estudo com SUT1 mostrou que RNAs mensageiros dos transportadores encontrados na membrana do

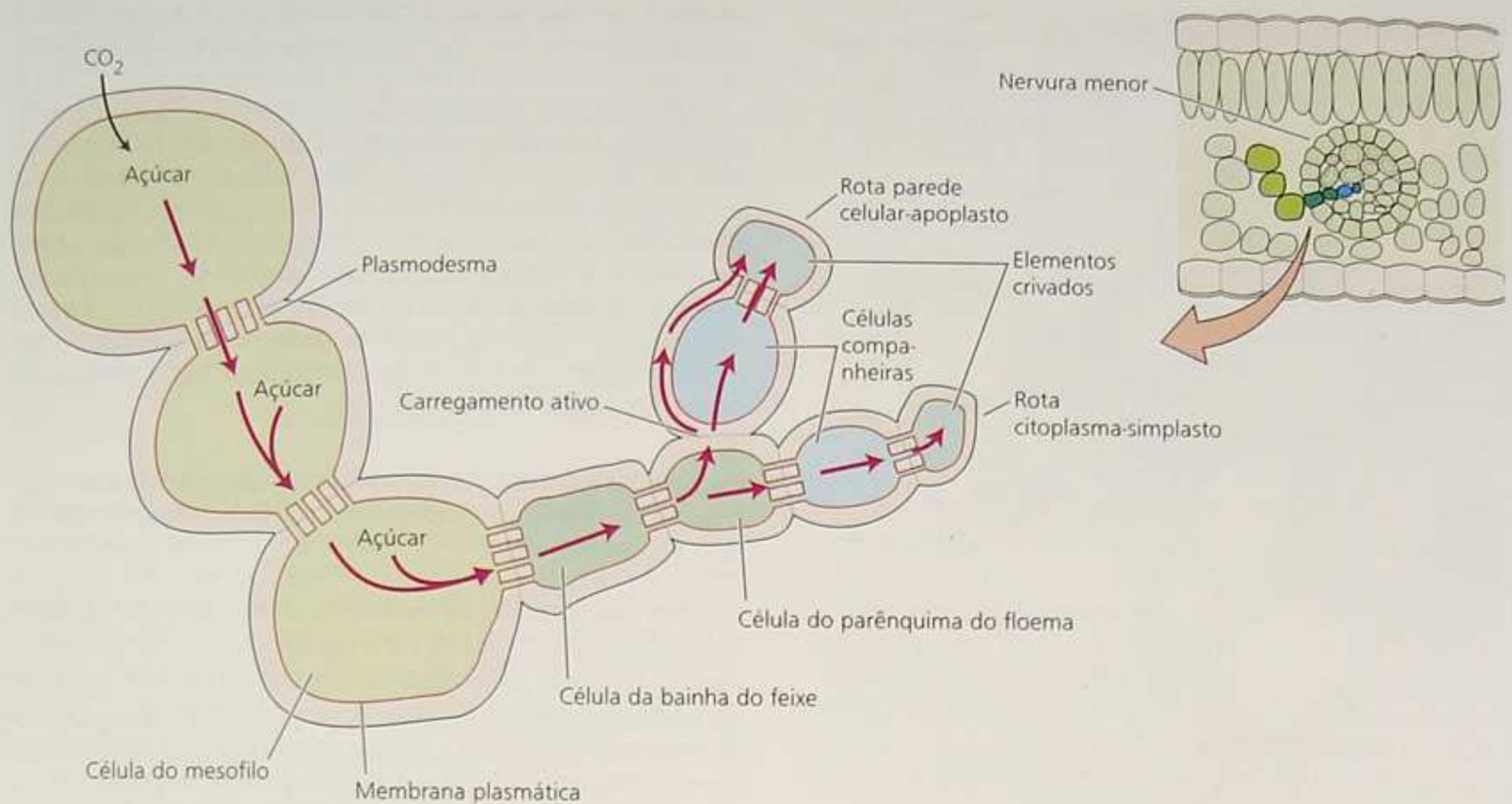



FIGURA 10.14 Esquema das rotas de carregamento do floema nas folhas-fonte. Na via totalmente simplástica, os açúcares movem-se de uma célula para outra pelos plasmodesmas, durante todo o percurso entre as células do mesofilo até os elementos crivados. Na rota parcialmente apoplástica, os açúcares entram no aploplasto em um determinado ponto. Para facilitar a compreensão, os açúcares são ilustrados entrando no apoplasto próximo do complexo elemento crivado-célula companheira, mas eles poderiam entrar no apoplasto no princípio da rota e, então, moverem-se para as nervuras menores. Em qualquer caso, os açúcares são ativamente carregados do apoplasto para as células companheiras e os elementos crivados. Os açúcares carregados nas células companheiras parecem se mover para os elementos crivados através dos plasmodesmas.

FIGURA 10.15 Esta auto-radiografia mostra que o açúcar marcado move-se do apoplasto para os elementos crivados e células companheiras contra seu gradiente de concentração. Uma solução de sacarose marcada com C^{14} foi aplicada por 30 minutos à superfície superior de uma folha de beterraba (*Beta vulgaris*), que havia sido previamente mantida em ausência de luz por três horas. A cutícula da folha foi removida para permitir a penetração da solução na folha. O açúcar marcado se acumulou nas nervuras menores, nos elementos crivados e nas células companheiras da folha-fonte, indicando a capacidade destas células em transportar sacarose contra seu gradiente de concentração (Fondy, 1975, gentilmente cedida por D. Geiger).

elemento crivado são sintetizados nas células companheiras (Kuhn e cols., 1997). Tais descobertas estão de acordo com o fato de que os elementos crivados não apresentam núcleo. Provavelmente, a proteína do transportador também é sintetizada nas células companheiras, visto que os ribossomos parecem não persistir nos elementos crivados maduros.

Os papéis desempenhados pelos diferentes carregadores listados na Tabela 10.3 ainda estão sendo elucidados. A maioria dos transportadores e é encontrada nos tecidos-fonte da rota e nos tecidos-dreno. O SUT1, caracterizado como um transportador de alta afinidade/baixa capacidade encontrado nas nervuras menores dos tecidos-fonte, parece ter importância no carregamento do floema. As plantas de batata transformadas com DNA anti-senso de SUT1 apresentam atividade reduzida do transportador, redução no crescimento da raiz e dos tubérculos e acúmulo de amido e lipídeos nas folhas-fonte (Schulz e cols., 1998).

O SUT1 parece, também, ter função na recuperação da sacarose perdida durante o trânsito. A importante função do SUT1 no carregamento do floema parece ser complementada pelo SUT4, um carregador de baixa afinidade/ alta capacidade (Weise e cols., 2000). Por outro lado, o SUT2 parece ter função como sensor de sacarose. Isto é indicado por descobertas que demonstram que SUT2 é mais altamente expresso nos tecidos da rota e do dreno do que nas folhas-fonte e pela similaridade entre muitas características estruturais do SUT2 e de sensores de açúcares de leveduras (Lalonde e

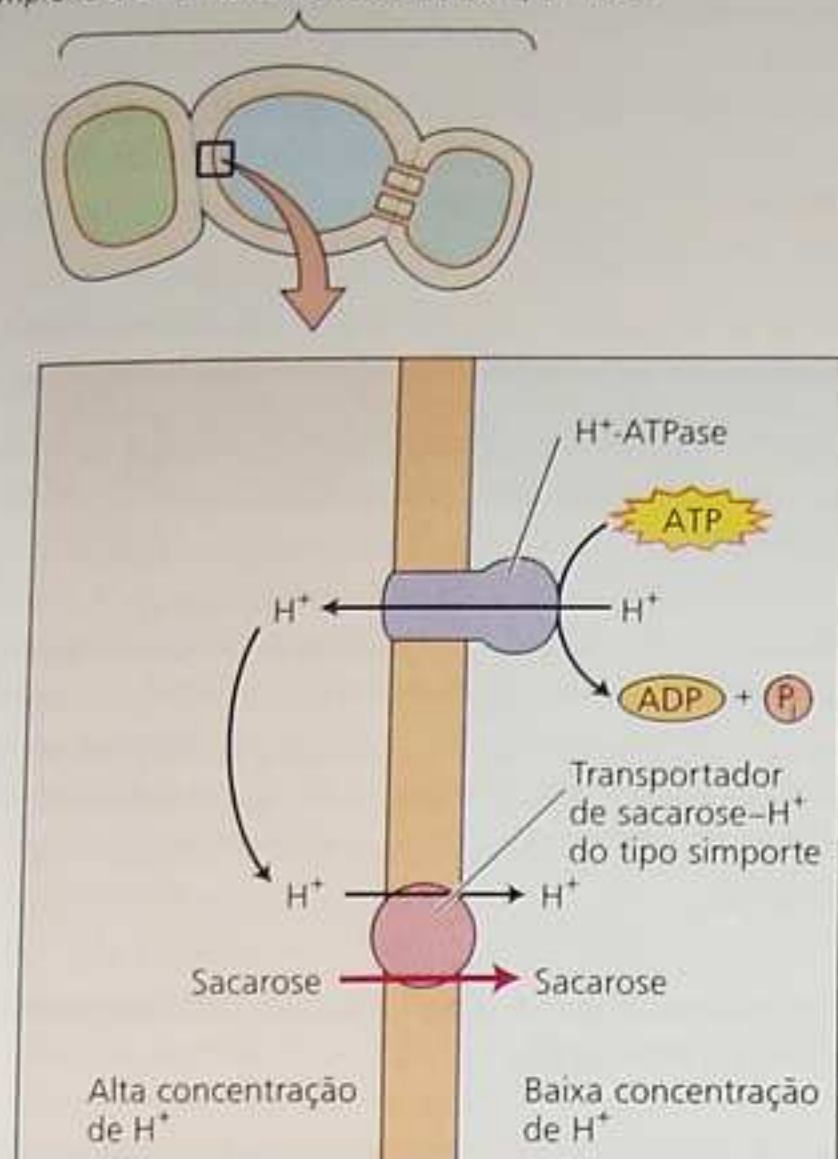



FIGURA 10.16 Transporte de sacarose ATP-dependente no carregamento do elemento crivado. No modelo do co-transporte do carregamento da sacarose para o simplasto do complexo elemento crivado-célula companheira, a ATPase da membrana plasmática bombeia prótons para fora da célula no apoplasto, estabelecendo uma alta concentração de prótons extracelular. A energia neste gradiente de prótons é, então, utilizada como motriz para o transporte de sacarose para o simplasto do complexo elemento crivado-célula companheira via transportador de sacarose-H^+ do tipo simporte.

cols., 1999; Barker e cols., 2000). Por fim, a absorção pelas células companheiras parece ser a função do SUC2.

Regulação do carregamento de sacarose. O mecanismo que regula o carregamento de sacarose do apoplasto para os elementos crivados pelo transportador de sacarose-H^+ do tipo simporte ainda não foi caracterizado. Os possíveis fatores de regulação incluem os seguintes:

- *O potencial osmótico ou, mais provavelmente, a pressão de turgor dos elementos crivados.* Um decréscimo de turgor do elemento crivado abaixo de um certo limiar levaria a um aumento compensatório no carregamento.
- *A concentração de sacarose no apoplasto.* As altas concentrações de sacarose no apoplasto aumentariam o carregamento do floema.
- *O número disponível de moléculas de proteínas do tipo simporte.* Os níveis de mRNA e da proteína transportadora SUT1 foram mais baixos após 15 horas de escuro do que após um tratamento de luz. Estes dados sugerem que a concentração das moléculas transportadoras SUT1 pode regular o carregamento.

Outros estudos demonstraram que o efluxo de sacarose para o apoplasto é aumentado pela disponibilidade de potássio no mesmo, sugerindo que um melhor suprimento de nutrientes aumenta a translocação para os tecidos-dreno, promovendo o seu crescimento.

O carregamento do floema parece ser simplástico em plantas com células intermediárias

Conforme o que foi discutido anteriormente, muitos resultados apontam para o carregamento apoplástico do floema em espécies que apresentam células companheiras ordinárias ou células de transferência nas nervuras menores e que transportam apenas sacarose. Por outro lado, uma rota simplástica tem-se tornado evidente em espécies que transportam rafinose e estaquiose no floema, além da sacarose, e que apresentam células intermediárias nas nervuras menores. Alguns exemplos de tais espécies incluem coleus (*Coleus blumei*), abobrinha (*Cucurbita pepo*) e melão (*Cucumis melo*) (ver **Tópico 10.8 na Internet**).

O funcionamento da via simplástica requer a presença de plasmodesmas abertos entre as diferentes células da rota. Muitas espécies apresentam numerosos plasmodesmas na interface entre o complexo elemento-crivado célula companheira e as células adjacentes (ver Figura 10.7C), e os estudos experimentais demonstraram uma continuidade simplástica nas folhas-fonte de algumas espécies (ver **Tópico 10.8 na Internet**).

O modelo de aprisionamento de polímeros explica o carregamento simplástico nas folhas-fonte

A composição da seiva do elemento crivado é em geral diferente da composição de soluto dos tecidos adjacentes ao floema.

TABELA 10.3
Transportadores de sacarose-H^+ do tipo simporte no floema

Carregadores	Localização	Espécies	Afinidade	Fonte
SUT1	Elementos crivados	Tabaco, tomate, batata	Alta	Kuhn e cols., 1997
SUT2	Elementos crivados	Tomate	Sensor	Barker e cols., 2000
SUT4	Elementos crivados	*Arabidopsis*, tomate, batata	Baixa	Weise e cols., 2000
SUC2	Células companheiras	*Arabidopsis*, tansagem	–	Truernit e Sauer, 1995; Stadler e cols., 1995

Esta diferença indica que certos açúcares são especificamente selecionados para transporte na folha-fonte. O envolvimento de transportadores do tipo simporte no carregamento apoplástico do floema fornece um mecanismo claro para seletividade, pois os transportadores são específicos para certas moléculas de açúcares. O carregamento simplástico, por outro lado, depende da difusão de açúcares do mesofilo para os elementos crivados, através dos plasmodesmas. É mais difícil prever como a difusão pelos plasmodesmas durante o carregamento simplástico poderia ser seletiva para determinados açúcares.

Além disso, os dados obtidos em diversas espécies sobre o carregamento simplástico indicam que os elementos crivados e as células companheiras apresentam um conteúdo osmótico mais alto do que o mesofilo. Como o carregamento simplástico dependente da difusão poderia ser responsável pela seletividade das moléculas transportadas e pelo acúmulo de açúcares contra o gradiente de concentração?

O **modelo de aprisionamento de polímeros** (do inglês, *Polymer-Trapping Model*) (Figura 10.17) foi desenvolvido para esclarecer estas questões (Turgeon e Gowan, 1990). O modelo postula que a sacarose sintetizada no mesofilo difunde-se das células da bainha do feixe para as células intermediárias por meio dos abundantes plasmodesmas que conectam esses dois tipos celulares. Nas células intermediárias, a rafinose e a estaquiose (polímeros formados por três ou quatro hexoses, respectivamente; ver Figura 10.9B) são sintetizadas a partir da sacarose transportada e da galactose. Em decorrência da anatomia do tecido e do tamanho relativamente grande da rafinose e da estaquiose, os polímeros não podem se difundir de volta para as células da bainha do feixe, mas para os elementos crivados. A sacarose pode continuar a difundir-se para as células intermediárias, pois sua síntese no mesofilo e sua utilização nas células intermediárias mantêm o gradiente de concentração (ver Figura 10.17).

O modelo de aprisionamento de polímeros faz três suposições:

1. A sacarose deveria estar mais concentrada no mesofilo do que nas células intermediárias.
2. As enzimas para a síntese de rafinose e estaquiose deveriam estar preferencialmente localizadas nas células intermediárias.
3. Os plasmodesmas que ligam as células da bainha vascular e as células intermediárias deveriam excluir moléculas maiores do que a sacarose.

Muitos estudos sustentam o modelo de aprisionamento de polímeros. Por exemplo, todas as enzimas necessárias para a síntese de estaquiose a partir de sacarose foram encontradas nas células intermediárias. Em melão, a rafinose e a estaquiose estão presentes em altas concentrações nas células intermediárias, mas não nas do mesofilo.

O tipo de carregamento do floema está correlacionado à família botânica e ao clima

Conforme foi discutido, o funcionamento das rotas apoplástica ou simplástica de carregamento do floema está correlacionado com o açúcar transportado, com o tipo de célula companheira nas nervuras menores e com o número de plasmodesmas conectando os elementos crivados e as células companheiras às células fotossintetizantes adjacentes (Tabela 10.4) (van Bel e cols., 1992):

Célula da bainha vascular
Célula intermediária
Elemento crivado
Glicose
Frutose
Sacarose
Galactose
Sacarose
Rafinose
Plasmodesma

A sacarose, sintetizada no mesofilo, difunde-se das células da bainha vascular para as células intermediárias através dos plasmodesmas abundantes.

Nas células intermediárias, a rafinose (e a estaquiose) são sintetizadas a partir de sacarose e galactose, mantendo, assim, o gradiente de difusão para a sacarose. Devido às suas dimensões, tais açúcares não são capazes de se difundir de volta para o mesofilo.

A rafinose e a estaquiose são capazes de se difundir para os elementos crivados. Como resultado, a concentração do açúcar transportado aumenta nas células intermediárias e nos elementos crivados.

FIGURA 10.17 Modelo de aprisionamento de polímeros para o carregamento do floema. Para simplificar, o trissacarídeo estaquiose foi omitido (van Bel, 1992).

- As espécies que apresentam carregamento apoplástico do floema translocam quase exclusivamente sacarose, apresentam células companheiras ou células de transferência nas nervuras menores e possuem poucas conexões entre o complexo elemento crivado-célula companheira e as células adjacentes.
- As espécies que apresentam carregamento simplástico do floema translocam oligossacarídeos, tal como rafinose, além da sacarose, apresentam células companheiras do tipo intermediárias nas nervuras menores e possuem abundantes conexões entre o complexo elemento crivado-célula companheira e as células adjacentes.

As plantas que apresentam abundantes plasmodesmas entre o floema e as células adjacentes são freqüentemente árvores, arbustos ou trepadeiras. Já as herbáceas exibem poucos plasmodesmas nessa interface. Em geral, aquelas com plasmodesmas abundantes entre o floema e as células adjacentes tendem a ser encontradas nas regiões tropical e subtropical, enquanto plantas com poucos plasmodesmas são encontradas em especial em climas temperados e áridos.

Há casos intermediários e exceções a essas generalizações. Algumas espécies com carregamento apoplástico apresentam mais plasmodesmas ligando suas células companheiras às células adjacentes do que seria previsível para espécies com carregamento apoplástico (Goggin e cols., 2001). Algumas espécies apresentam mais de um tipo de células companheiras nas suas nervuras menores. Por exemplo, *Coleus blumei* apresenta tanto células intermediárias quanto células companheiras ordinárias. Tem sido sugerido que as rotas apoplástica e simplástica podem coexistir em algumas espécies, simultaneamente ou em tempos diferentes, em distintos elementos crivados da mesma nervura ou em elementos crivados de nervuras de diferentes tamanhos (Turgeon e cols., 2001).

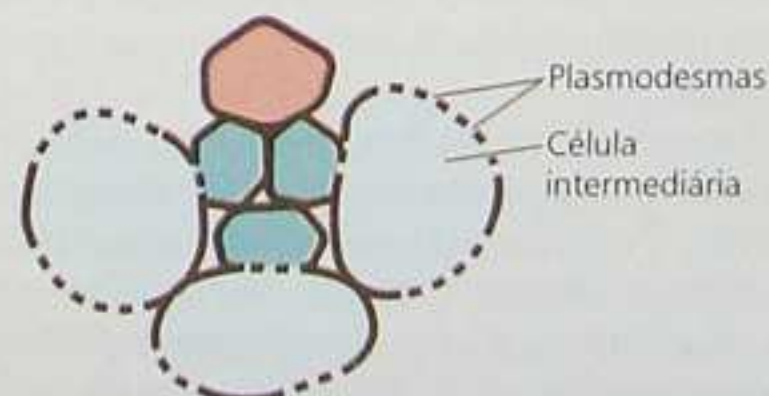
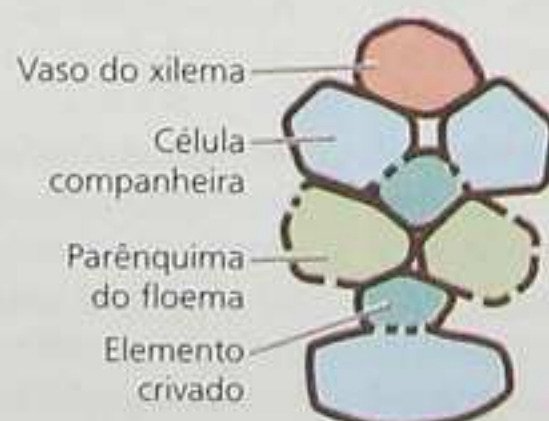
As pesquisas futuras podem revelar novas rotas de carregamento ou combinações de rotas (Flora e Madore 1996). Com certeza, a evolução dos diferentes tipos de carregamento e como estes tipos adaptaram as espécies aos seus ambientes serão importantes áreas de pesquisa no futuro, assim como o esclarecimento das rotas de carregamento em maior número de espécies.

DESCARREGAMENTO DO FLOEMA E A TRANSIÇÃO DRENO-FONTE

Como os eventos que levam à exportação de açúcares já foram discutidos, examinaremos o processo de descarregamento do floema. De muitas formas, os eventos nos tecidos-dreno são simplesmente o reverso dos eventos que ocorrem nos tecidos-fonte. O transporte para os órgãos-dreno, como as raízes em desenvolvimento, os tubérculos e as estruturas reprodutivas, é denominado **importação**. As etapas seguintes estão envolvidas na importação de açúcares pelas células-dreno.

1. *Descarregamento dos elementos crivados.* Este é o processo pelo qual os açúcares importados deixam os elementos crivados dos tecidos-dreno.
2. *Transporte em curta distância.* Após o descarregamento dos elementos crivados, os açúcares são transportados para as células no dreno, por meio de uma via de transporte de curta

TABELA 10.4
Padrões de carregamento apoplástico e simplástico

	Carregamento apoplástico	Carregamento simplástico
Açúcar transportado	Sacarose	Oligossacarídeos além da sacarose
Tipo de células companheiras nas nervuras menores	Células companheiras ordinárias ou de transferência	Células intermediárias
Número de plasmodesmas conectando os elementos crivados e as células companheiras às células adjacentes	Poucos	Abundantes

Fonte: Desenhos de van Bel e cols., 1992
Nota: Algumas espécies podem fazer o carregamento tanto pela via apoplástica quanto pela simplástica, pois tipos diferentes de células companheiras podem ser encontrados nas nervuras de uma mesma espécie.

distância. Essa rota é também chamada de *transporte pós-elemento crivado*.

3. *Armazenamento e metabolismo*. Na etapa final, os açúcares são armazenados e metabolizados nas células-dreno.

Estas três etapas de transporte constituem o **descarregamento do floema**, o movimento dos fotossintatos dos elementos crivados e sua distribuição para as células-dreno, que os armazenam ou metabolizam (Oparka e van Bel, 1992).

Nesta seção, serão discutidas as seguintes questões: O descarregamento do floema é simplástico ou apoplástico? A sacarose é hidrolisada durante o processo? O descarregamento do floema requer energia? E, por último, examinar-se-á o processo de transição pelo qual uma folha importadora jovem se torna uma célula-fonte exportadora.

O descarregamento do floema pode ocorrer através das rotas simplástica e apoplástica

Nos órgãos-dreno, os açúcares movem-se dos elementos crivados para as células que estocam ou metabolizam essas moléculas. Os drenos variam amplamente de órgãos vegetativos em crescimento (ápices de raízes e folhas jovens) a órgãos de reprodução e dispersão (frutos e sementes). Pelo fato de os drenos variarem tanto em estrutura e função, não há um esquema único para o descarregamento do floema. Como nas fontes, os açúcares podem se mover completamente por meio do simplasto pelos plasmodesmas ou podem entrar no apoplasto em determinado ponto da via.

O diagrama da Figura 10.18 ilustra as várias rotas possíveis de descarregamento do floema. A rota de descarregamento parece ser completamente simplástica em algumas das folhas jovens de dicotiledôneas, como em beterraba e tabaco (Figura 10.18A). As evidências para o transporte simplástico incluem a insensibilidade ao PCMBS (ácido p-cloromercuribenzeno-sulfônico), um reagente que inibe o transporte da sacarose através da membrana plasmática, mas não atravessa a rota simplástica. As regiões meristemáticas e de alongamento dos ápices das raízes primárias também parecem apresentar o descarregamento simplástico. Há plasmodesmas suficientes nessas rotas para dar suporte ao descarregamento simplástico.

Em alguns órgãos-dreno, parte da rota de descarregamento do floema é apoplástica (Figura 10.18B). Em princípio, a etapa apoplástica poderia estar localizada no complexo elemento crivado-célula companheira (Tipo 1 na Figura 10.18B), embora este padrão ainda não tenha recebido suporte experimental. A etapa apoplástica poderia também ser posteriormente removida dos elementos crivados (Tipo 2). Este arranjo, típico de sementes em desenvolvimento, parece ser o mais comum no descarregamento apoplástico do floema.

Uma etapa apoplástica é necessária nas sementes em desenvolvimento, pois não há conexões citoplasmáticas entre os tecidos maternos e os tecidos do embrião. Os açúcares saem dos elementos crivados (descarregamento do elemento crivado) através da rota simplástica e são transferidos do simplasto para o apoplasto em determinado ponto distante do complexo elemento crivado-célula companheira (Tipo 2 na Figura 10.18B). A etapa apoplástica permite o controle da membrana sobre as substâncias que entram no embrião, pois duas membranas devem ser atravessadas no processo.

Quando o descarregamento do floema é apoplástico, o açúcar de transporte pode ser parcialmente metabolizado no apoplasto ou pode atravessar o apoplasto sem sofrer modificações (ver **Tópico 10.9 na Internet**). Por exemplo, a sacarose pode ser hidrolisada à glicose e à frutose no apoplasto pela invertase, uma enzima de clivagem da sacarose, e a glicose e/ou frutose poderiam entrar nas células-dreno. Conforme será discutido, tais enzimas de clivagem da sacarose têm função no controle que os tecidos-dreno exercem sobre o transporte no floema.

O transporte para os tecidos-dreno necessita de energia metabólica

Estudos com inibidores têm demonstrado que a importação para os tecidos-dreno é dependente de energia. As folhas em crescimento, as raízes e os tecidos de reserva, nos quais o carbono é armazenado como amido ou proteína, utilizam o descarregamento simplástico do floema. Os açúcares de transporte são usados como substrato para a respiração e metabolizados em polímeros de reserva e em compostos necessários para o crescimento. O metabolismo da sacarose resulta em uma baixa concentração desse açúcar nas células-dreno, mantendo, assim, o gradiente de concentração para a absorção de açúcar. Durante a absorção de açúcar nas células-dreno não ocorre o transporte pelas membranas e o descarregamento, através dos plasmodesmas, é passivo, pois os açúcares movem-se de uma alta concentração nos elementos crivados para uma baixa concentração nas células-dreno. Portanto, nesses órgãos-dreno, a energia metabólica é necessária para respiração e reações de biossíntese.

No descarregamento apoplástico do floema, os açúcares devem cruzar, pelo menos, duas membranas: a membrana plasmática da célula que está exportando o açúcar e a membrana plasmática da célula-dreno. Quando os açúcares são transportados para o vacúolo da célula-dreno, eles devem também atravessar o tonoplasto.

O transporte, através de membranas em uma via apoplástica, pode ser dependente de energia, conforme já foi visto. As sementes em desenvolvimento são sistemas experimentais importantes para o estudo dos processos de descarregamento. Em leguminosas, como a soja, o embrião pode ser removido da semente e o descarregamento do tegumento da semente no apoplasto pode ser estudado, sem a influência do embrião. Tais estudos têm demonstrado que transportadores dependentes de energia agem como intermediários para o descarregamento de sacarose no apoplasto e para a absorção deste açúcar pelo embrião da soja (ver **Tópico 10.10 na Internet**).

A transição da uma folha de dreno para fonte é gradual

As folhas de dicotiledôneas, como das plantas de tomateiro ou feijoeiro, iniciam seu desenvolvimento como órgãos-dreno. Uma transição entre o estado de dreno e de fonte ocorre mais tarde no desenvolvimento, quando a folha está aproximadamente com 25% de expansão, e, normalmente, completa-se quando a folha está expandida em 40 a 50%.

A exportação a partir da folha inicia na extremidade ou ápice da lâmina foliar e progride em direção a base até que toda a folha torne-se exportadora de açúcar. Durante o período de transição, a extremidade exporta açúcar, enquanto que a base o importa de outras folhas-fonte (Figura 10.19).

(A) **Descarregamento simplástico do floema**

Rota de descarregamento do floema

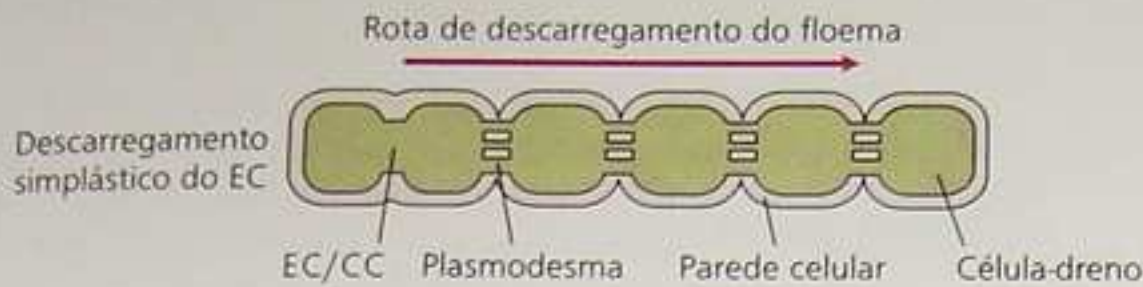
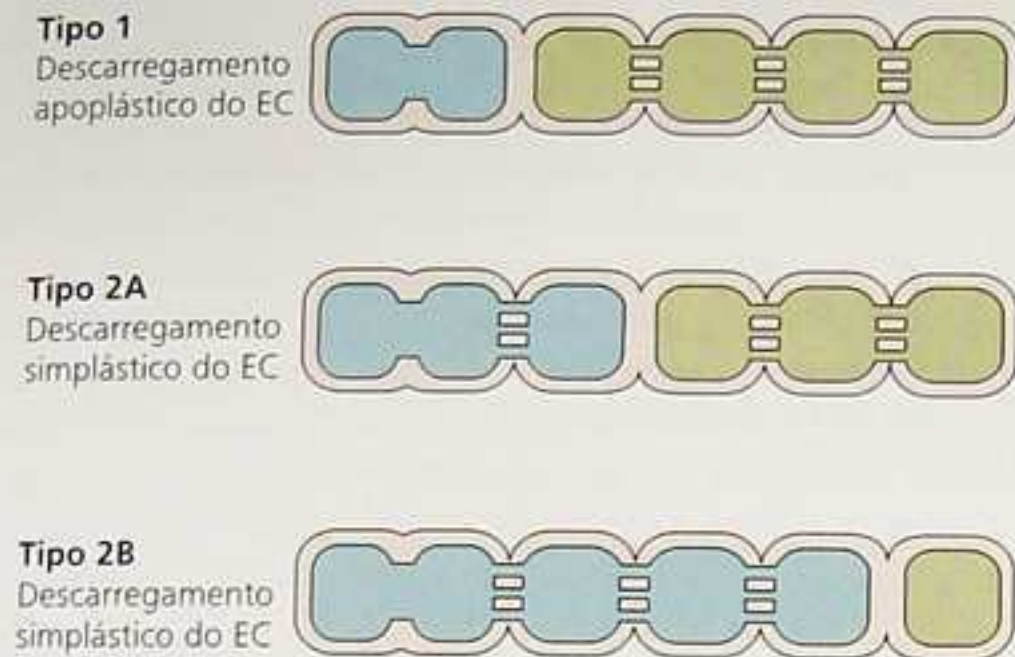
Descarregamento simplástico do EC

EC/CC Plasmodesma Parede celular Célula-dreno

(B) **Descarregamento apoplástico do floema**

Tipo 1
Descarregamento apoplástico do EC

Tipo 2A
Descarregamento simplástico do EC

Tipo 2B
Descarregamento simplástico do EC

Tipo 1: Esta rota de descarregamento do floema é designada apoplástica, pois uma etapa, o transporte do complexo elemento crivado-célula companheira para as sucessivas células-dreno, ocorre no apoplasto. Uma vez que os açúcares estejam de volta ao simplasto das células contíguas, o transporte é simplástico. A rota não foi ainda demonstrada em todos os tipos de dreno.

Tipo 2: Esta rota também apresenta uma etapa apoplástica. No entanto, a saída do complexo elemento crivado-célula companheira — isto é, o descarregamento do elemento crivado — é simplástica. A etapa apoplástica ocorre mais tarde na via. A figura superior (2A) ilustra uma etapa apoplástica próxima do complexo elemento crivado-célula companheira; a figura inferior (2B), mostra uma etapa apoplástica mais distante.

FIGURA 10.18 Rotas de descarregamento do floema. O complexo elemento crivado-célula companheira (EC/CC) é considerado uma unidade funcional isolada. A presença de plasmodesmas estabelece uma continuidade simplástica funcional. A ausência de plasmodesmas entre as células indica a etapa de transporte apoplástico. (A) Descarregamento simplástico do floema. (B) Três tipos de descarregamento apoplástico do floema (Oparka e van Bel, 1992).

A maturação das folhas é acompanhada por um grande número de mudanças anatômicas e funcionais, muitas das quais são necessárias à exportação dos fotossintatos. A transição dreno-fonte é bastante diferente entre espécies com carregamento apoplástico ou simplástico. Nas folhas com carregamento apoplástico do floema, uma drástica mudança de uma rota de descarregamento simplástico para uma rota apoplástica deve ocorrer.

No desenvolvimento de uma folha que fará o carregamento de modo apoplástico, a interrupção da importação e o início da exportação são eventos independentes (Turgeon, 1984). Em folhas albinas de tabaco, que não apresentam clorofila e são, portanto, incapazes de realizar fotossíntese, a importação pára no mesmo estádio de desenvolvimento das folhas verdes, embora a exportação não seja possível. Portanto, algumas outras mudanças devem ocorrer nas folhas de tabaco em desenvolvimento para que elas cessem a importação de açúcares.

Tal mudança envolveria o bloqueio da rota de descarregamento em um determinado ponto do desenvolvimento de folhas maduras. Nas folhas-dreno de dicotiledôneas que apresentam descarregamento simplástico, os fatores que poderiam ser responsáveis por essa interrupção no descarregamento incluem o fechamento dos plasmodesmas, o decréscimo na freqüência de plasmodesmas e outras mudanças na continuidade do simplasto. Dados experimentais têm mostrado que a rota de descarregamento é bloqueada em folhas maduras de carregadores apoplásticos.

A exportação de açúcares inicia quando o carregamento do floema acumula fotossintatos suficientes nos elementos crivados para acionar a translocação para fora da folha. Em folhas normais, com carregamento apoplástico, a exportação inicia quando:

- A rota de descarregamento simplástico é interrompida.
- A folha está sintetizando fotossintatos em quantidade suficiente, de modo que um pouco está disponível para exportação.
- O transportador de sacarose-H^+ do tipo simporte está localizado no plasmalema do complexo elemento crivado-célula companheira.

Em folhas de plantas como beterraba e tabaco, a capacidade de acumular sacarose exógena marcada com C^{14} no complexo elemento crivado-célula companheira é adquirida à medida que as folhas entram na transição dreno-fonte, sugerindo que o transportador do tipo simporte, necessário para o carregamento do floema, tornou-se funcional. Nas folhas em desenvolvimento de *Arabidopsis*, a expressão do transportador do tipo simporte, que parece ser o responsável pelo transporte de açúcares durante o carregamento, inicia na extremidade e prossegue em direção à base durante a transição dreno-fonte. O mesmo padrão basípeto é visto no desenvolvimento da capacidade de exportação.

Em tabaco e outras espécies de *Nicotiana*, as nervuras menores, eventualmente responsáveis pela maioria do carregamento, não atingem a maturidade até que a importação cesse. Assim, os

(A) (B) (C) (D)

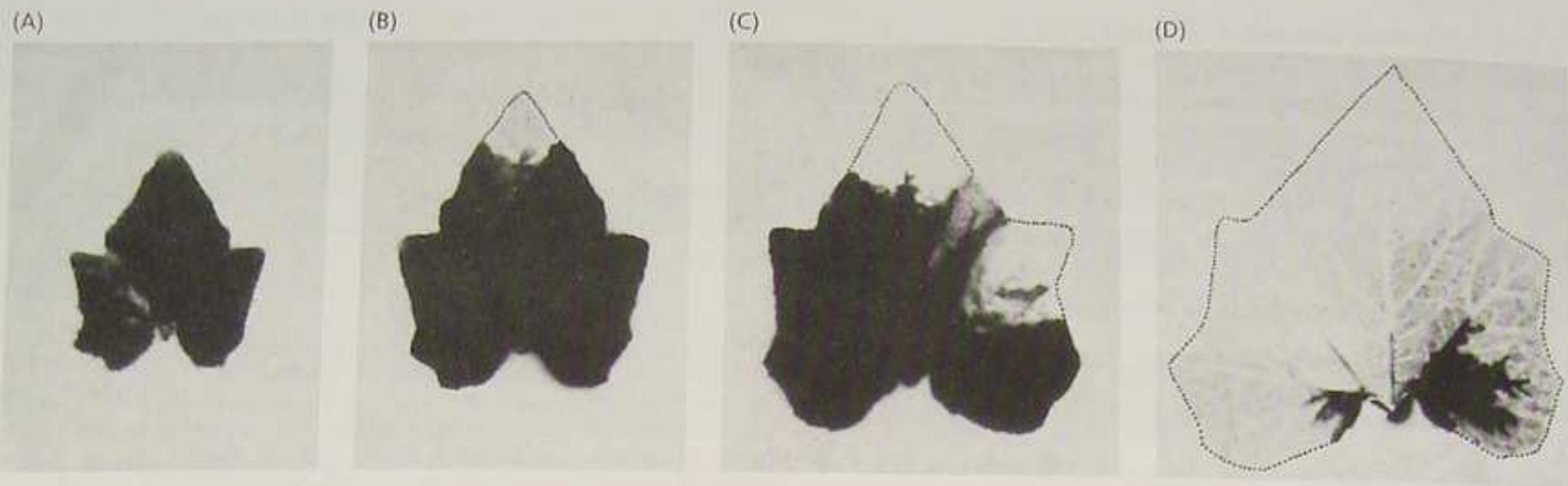



FIGURA 10.19 Auto-radiografias de uma folha de abobrinha (*Cucurbita pepo*), ilustrando a transição da folha do estado de dreno para fonte. Em cada caso, a folha importou o C^{14} da folha-fonte na planta por 2 horas. O carbono marcado é visualizado como o acúmulo preto. (A) A folha inteira como um dreno, importando açúcar da folha-fonte. (B-D) A base ainda é dreno. À medida que a extremidade da folha perde a capacidade de descarregar e deixa de importar açúcar (como indicado pela perda dos acúmulos pretos), ela adquire a capacidade de carregar e exportar açúcar (Turgeon e Webb, 1973).

açúcares são descarregados e carregados quase completamente por nervuras diferentes (Roberts e cols., 1997).

Em folhas, nas quais a rota simplástica de descarregamento é mantida para o carregamento, a transição da importação para a exportação é até certo ponto reversível. Em folhas de *Coleus blumei* com regiões albinas e regiões verdes, as porções albinas das folhas maduras mantêm muitas das características de dreno. As regiões verdes das folhas podem exportar fotossintatos para as regiões albinas; se as regiões verdes forem removidas, as regiões albinas podem importar e descarregar açúcares de outras folhas maduras.

ALOCAÇÃO E PARTIÇÃO DE FOTOSSINTATOS

A taxa fotossintética determina a quantidade total de carbono fixado disponível para a folha. Entretanto, a quantidade de carbono fixado disponível para translocação depende dos eventos metabólicos subseqüentes. A regulação do desvio do carbono fixado em várias rotas metabólicas é denominada **alocação**.

Os feixes vasculares em uma planta formam um sistema de tubos que podem direcionar o fluxo dos fotossintatos para vários tecidos-dreno: folhas jovens, caules, raízes, frutos ou sementes. Entretanto, o sistema vascular é freqüentemente muito interconectado, formando uma rede aberta, que permite a comunicação entre as folhas-fonte e os múltiplos drenos. Sob tais condições, o que determina o volume de fluxo para um determinado dreno? A distribuição diferencial dos fotossintatos na planta é chamada de **partição**.

Após uma visão geral sobre alocação e partição, será examinada a coordenação da síntese do amido e da sacarose. Para concluir, será discutido como os drenos competem, como a demanda do dreno pode regular a taxa fotossintética na folha-fonte e como as fontes e os drenos se comunicam uns com os outros.

A alocação inclui a reserva, a utilização e o transporte do carbono fixado

O carbono fixado em uma célula-fonte pode ser usado para armazenamento, metabolismo e transporte:

- *Síntese dos compostos de reserva*. O amido é sintetizado e armazenado nos cloroplastos e, na maioria das espécies, é a principal forma de reserva mobilizada para translocação durante a noite. As plantas que armazenam carbono, principalmente como amido, são chamadas de *armazenadoras de amido*.
- *Utilização metabólica*. O carbono fixado pode ser utilizado em vários compartimentos da célula fotossintetizante, para satisfazer as necessidades energéticas da célula ou fornecer esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos necessários à célula.
- *Síntese dos compostos transportados*. O carbono fixado pode ser incorporado em açúcares de transporte para exportação para diferentes tecidos-dreno. Uma parte do açúcar de transporte pode também ser estocada temporariamente no vacúolo (ver **Tópico 10.9 na Internet**).

A alocação é também um processo-chave nos tecidos-dreno. Uma vez que os açúcares de transporte tenham sido descarregados nas células-dreno, eles podem permanecer como tal ou podem ser transformados em vários outros compostos. Nos drenos de reserva, o carbono fixado pode ser acumulado como sacarose ou hexose nos vacúolos ou como amido nos amiloplastos. Nos drenos em crescimento, os açúcares podem ser utilizados para respiração e para a síntese de outras moléculas necessárias ao crescimento.

Os açúcares de transporte sofrem partição entre os vários tecidos-dreno

Quanto maior a capacidade de um dreno estocar ou metabolizar os açúcares importados (o processo de alocação), maior sua capacidade de competir pelo fotossintato que está sendo exportado pelas fontes. Tal competição determina a distribuição dos açúcares de transporte entre os vários tecidos-dreno da planta (partição dos fotossintatos), pelo menos em curto prazo.

Obviamente, os eventos nas fontes e nos drenos devem ser sincronizados. O processo de partição determina os padrões de crescimento e tal crescimento deve ser equilibrado entre a parte aérea (produtividade fotossintética) e a raiz (absorção de água e minerais). Assim, existe um nível adicional de controle na interação entre as áreas de suprimento e de demanda.

A pressão de turgor nos elementos crivados poderia ser um meio importante de comunicação entre as fontes e os drenos, atuando na coordenação das taxas de carregamento e descarregamento. Os mensageiros químicos são também importantes na sinalização do estado de um órgão para o outro. Tais mensageiros químicos incluem os hormônios vegetais e os nutrientes, como o potássio e o fosfato, bem como os próprios açúcares transportados.

A obtenção de produtividades mais altas de plantas cultivadas é uma meta da pesquisa de alocação e partição dos fotossintatos. Enquanto os grãos e as frutas são exemplos de produção comestível, a produção total inclui partes não-comestíveis da parte aérea. A compreensão do processo de partição permite que os especialistas em melhoramento vegetal selecionem e desenvolvam variedades que apresentam um transporte melhorado para as porções comestíveis da planta. Progressos significativos têm sido obtidos na razão de produção comercial ou comestível para a produção total da parte aérea.

Os processos de alocação e de partição na planta como um todo devem ser coordenados de forma que o aumento do transporte para os tecidos comestíveis não ocorra à custa de outros processos e estruturas essenciais. A produção de plantas cultivadas será aumentada se os fotossintatos que são normalmente "perdidos" pela planta foram mantidos. Por exemplo, as perdas decorrentes da respiração não-essencial ou da exsudação pelas raízes poderiam ser reduzidas. Neste último caso, deve-se tomar cuidado para não interromper processos essenciais externos à planta, como o crescimento de espécies microbianas benéficas na região adjacente à raiz, que obtêm nutrientes a partir do exsudado da raiz.

A alocação nas folhas-fonte é regulada

Os aumentos na taxa de fotossíntese nas folhas-fonte geralmente resultam em um aumento na taxa de translocação a partir da fonte. Pontos de controle para alocação de fotossintatos (Figura 10.20) incluem a alocação de trioses fosfato para os seguintes processos:

- Regeneração de intermediários do ciclo fotossintético C_3 de redução do carbono (o ciclo de Calvin; ver Capítulo 8).
- Síntese de amido.
- Síntese de sacarose, bem como a distribuição da sacarose entre os *pools* de transporte e de armazenamento temporários.

Várias enzimas operam nas rotas que processam os fotossintatos e o controle dessas etapas é complexo (Geiger e Servaites, 1994).

Durante o dia, a taxa de síntese de amido nos cloroplastos deve ser coordenada com a síntese de sacarose no citoplasma. As trioses fosfato (gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato) produzidas no cloroplasto pelo ciclo de Calvin C_3 (ver Capítulo 8) podem ser usadas tanto para a síntese de amido quanto de sacarose. A síntese de sacarose no citoplasma desvia a triose fosfato da síntese e do armazenamento do amido. Por exemplo, tem sido mostrado que, quando a demanda para a sacarose por outras partes de uma planta de soja é alta, menos carbono é estocado como amido pelas folhas-fontes. As enzimas-chave envolvidas na regulação da síntese de sacarose no citoplasma e na síntese do amido no cloroplasto são a sacarose fosfato sintase e a frutose 1,6-bifosfatase no citoplasma e a ADP-glicose pirofosforilase no cloroplasto (ver Capítulo 8, Figura 10.20 e o **Tópico 10.9 na Internet**).

Entretanto, há um limite na quantidade de carbono que normalmente pode ser desviado da síntese de amido em espécies que estocam o carbono principalmente na forma deste polissacarídeo. Os estudos sobre alocação entre o amido e a sacarose sob diferentes condições sugerem que uma taxa relativamente estável de translocação durante um período de 24 horas é uma prioridade da maioria das plantas.

O uso de plantas mutantes e transgênicas permite avaliar novos aspectos sobre a alocação. Por exemplo, o que acontece quando um dos processos competidores, como a síntese de amido, é inibido ou mesmo eliminado? Os resultados têm revelado uma extraordinária flexibilidade das plantas. Por exemplo, mutantes de tabaco deficientes em amido sintetizam somente quantidades-traço de amido, mas são capazes de compensar a falta de carbono armazenado dobrando a taxa de síntese de sacarose e exportando durante o dia, e desviando a maior parte do seu crescimento para o período diurno (Geiger e cols., 1995). Por outro lado, as plantas com a síntese de amido intensificada durante o dia freqüentemente exportam a maior quantidade do seu carbono fixado durante a noite.

Os tecidos-dreno competem pelos fotossintatos translocados

Como já discutido, a translocação para os tecidos-dreno depende da posição do dreno em relação à fonte e das conexões vasculares entre a fonte e o dreno. Outro fator determinante do padrão de transporte é a competição entre os drenos. Por exemplo, os tecidos reprodutivos (sementes) podem competir com os tecidos vegetativos em crescimento (folhas jovens e raízes) pelos fotossintatos na corrente da translocação. Essa competição tem sido demonstrada em numerosos experimentos, nos quais a remoção de um tecido-dreno de uma planta geralmente resulta em aumento da translocação para drenos alternativos e, conseqüentemente, competitivos.

Em um tipo inverso de experimento, o suprimento das fontes pode ser alterado, enquanto os tecidos-dreno permanecem intactos. Quando o suprimento de fotossintatos das fontes para drenos competidores é repentina e drasticamente reduzido por sombreamento de todas as folhas, com exceção de uma, os tecidos-dreno tornam-se dependentes de uma única fonte. Na beterraba e no feijoeiro, as taxas de fotossíntese e de exportação a partir de uma

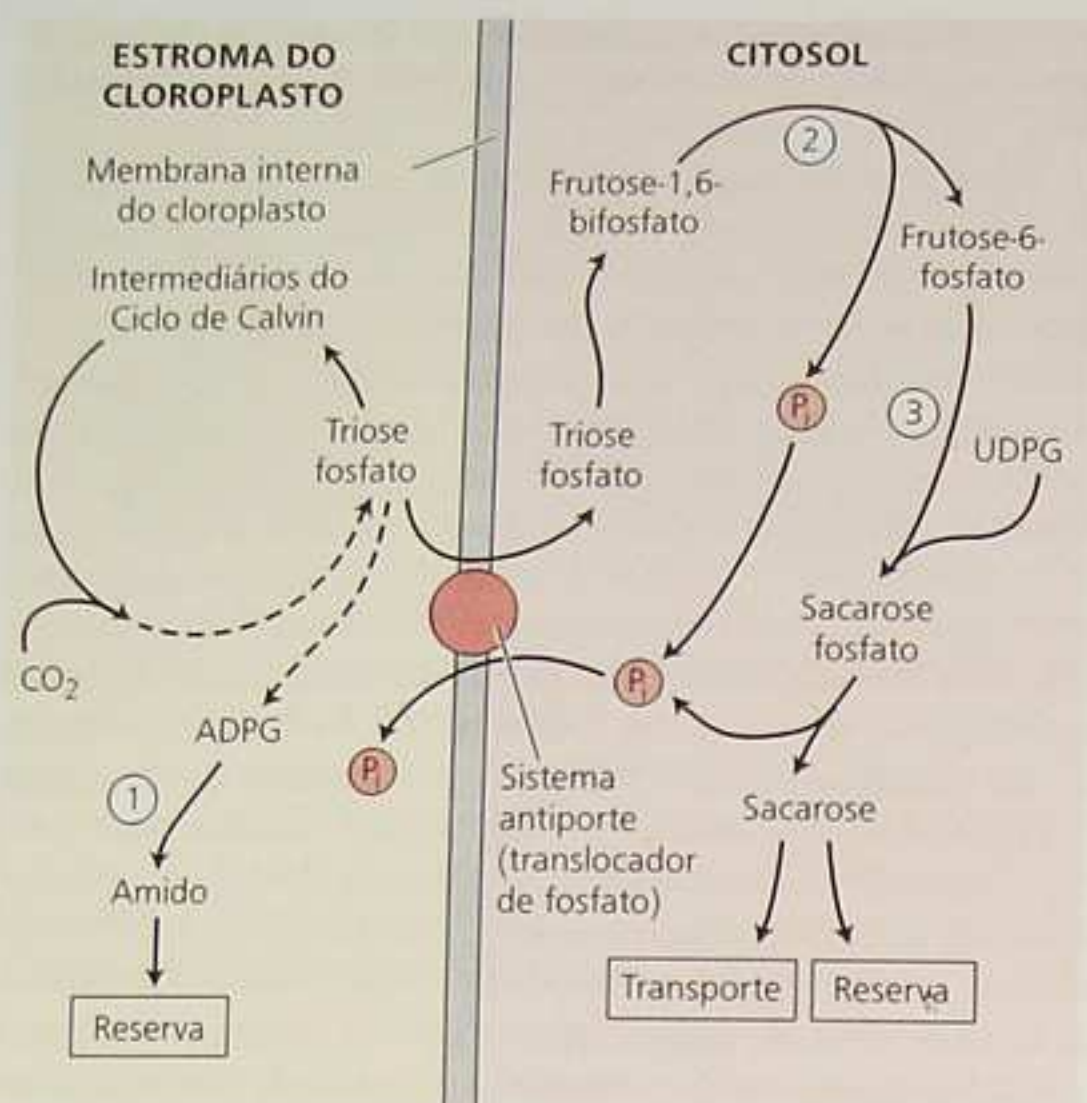



FIGURA 10.20 Um esquema simplificado para a síntese de amido e sacarose durante o dia. A triose fosfato, formada no ciclo de Calvin, pode ser utilizada na formação de amido no cloroplasto ou transportada para o citosol em troca de fosfato inorgânico (Pi), via translocador de fosfato na membrana interna do cloroplasto. A membrana externa do cloroplasto é permeável a moléculas e foi omitida aqui para simplificar o esquema. No citosol, a triose fosfato pode ser convertida em sacarose para sua estocagem no vacúolo ou para transporte. As enzimas-chave envolvidas são a amido sintetase (1), frutose-1,6-bifosfatase (2) e a sacarose fosfato sintase (3). A segunda e a terceira enzimas, juntamente com a ADP-glicose pirofosforilase, a qual forma a glicose adenosina difosfato (ADPG), são enzimas reguladas na síntese de amido e sacarose (ver Capítulo 8). UDPG, glicose uridina difosfato (Preiss, 1982).

única folha fonte remanescente não sofrem alterações em curto prazo (aproximadamente oito horas; Fondy e Geiger, 1980). Entretanto, as raízes recebem menos açúcar de uma única fonte, enquanto as folhas jovens recebem relativamente mais. Nesse sentido, sob tais condições, as folhas jovens são drenos mais fortes do que as raízes. Um dreno mais forte pode exaurir o conteúdo de açúcar dos elementos crivados mais rapidamente e, assim, aumentar o gradiente de pressão e a taxa de translocação em sua própria direção.

Um efeito no gradiente de pressão é também indicado indiretamente por experimentos nos quais os pesquisadores aumentam o transporte para um dreno, tornando o potencial hídrico mais negativo. O tratamento de extremidades de raízes de plântulas de ervilha com soluções de 350 m*M* de manitol aumenta a importação de sacarose [C^{14}] em mais de 300%, provavelmente devido ao decréscimo de turgor nas células-dreno (Schulz, 1994).

A intensidade do dreno é uma função do tamanho e da atividade do dreno

Vários experimentos indicam que a capacidade do dreno em mobilizar fotossintatos em sua direção, a **intensidade do dreno**, depende de dois fatores — o tamanho e a atividade do dreno — como indicado abaixo:

Intensidade do dreno = tamanho do dreno × atividade do dreno

O **tamanho do dreno** é o peso total do tecido-dreno e a **atividade do dreno** é a taxa de absorção de fotossintatos por unidade de peso do tecido-dreno. A alteração do tamanho ou da atividade do dreno resulta em mudanças nos padrões de translocação. Por exemplo, a capacidade de um legume de ervilha importar carbono depende do peso seco daquele legume como uma proporção do número total de legumes (Jeuffroy e Warembourg, 1991).

As mudanças na atividade do dreno podem ser complexas, pois várias atividades nos tecidos-dreno podem limitar potencialmente a taxa de absorção pelo mesmo. Tais atividades incluem o descarregamento dos elementos crivados, o metabolismo na parede celular, a absorção a partir do apoplasto e os processos metabólicos que utilizam os fotossintatos no crescimento ou no armazenamento.

O resfriamento de um tecido-dreno inibe as atividades que necessitam de energia metabólica e resulta na diminuição da velocidade do transporte em direção ao dreno. No milho, um mutante que apresenta uma enzima defectiva para a síntese de amido nos grãos transporta menos material para os grãos do que as plantas não-mutantes (Koch e cols., 1982). Nesse mutante, a deficiência no armazenamento de fotossintatos leva à inibição do transporte.

A atividade do dreno e, portanto, a sua intensidade estão também relacionadas à presença e à atividade das enzimas de clivagem de sacarose, a invertase ácida e a sacarose sintase, pois elas catalisam a primeira etapa da utilização de sacarose. Se tais enzimas controlam a intensidade do dreno ou simplesmente estão relacionadas ao metabolismo e ao crescimento do dreno é, na atualidade, um tópico ativo da pesquisa. Curiosamente, os genes da sacarose sintase e da sacarose invertase estão entre aqueles regulados pelo suprimento de carboidrato. Em geral, a diminuição de carboidratos promove a expressão dos genes da fotossíntese, da mobilização de reservas e dos processos de exportação, enquanto recursos abundantes de carbono favorecem a expressão de genes de armazenamento e utilização (Koch, 1996).

Entretanto, a descoberta de que distintas isoformas da sacarose sintase, codificadas por diferentes genes, respondem de modo antagônico ao suprimento de carboidratos, indica que o controle geral é complexo. Por exemplo, o mRNA de um gene de sacarose sintase em raízes de milho é amplamente distribuído nos tecidos da raiz e sua expressão é maximizada quando os açúcares são abundantes. O mRNA de um segundo gene da sacarose sintase é mais abundante na epiderme e tecidos externos e mais expresso sob condições de depleção de açúcares. Assim, a utilização dos açúcares importados é amplamente maximizada quando o suprimento de açúcares é abundante, porém, quando o suprimento de açúcar é baixo, a utilização é restrita aos locais que são cruciais para absorção de água e minerais (Koch e cols., 1996).

Além disso, os genes da sacarose sintase e da invertase são freqüentemente expressos em momentos distintos durante o desenvolvimento do dreno. Em legumes de feijão e grãos de milho foi observado que mudanças na atividade da invertase precedem as mudanças na importação de fotossintatos. Estes resultados indicam o papel-chave das duas enzimas no controle dos padrões de importação, tanto durante o programa genético de desenvolvimen-

to quanto durante as respostas a estresses ambientais (ver Tópico 10.9 na Internet).

As mudanças na razão fonte-dreno levam a alterações de longo prazo nas fontes

Se, em uma planta de soja, onde as folhas foram sombreadas, uma única folha permanecer descoberta por um longo período (oito dias, por exemplo), muitas mudanças ocorrerão na folha-fonte remanescente. Tais mudanças incluem o decréscimo na concentração de amido e o aumento na taxa fotossintética, na atividade da rubisco, na concentração de sacarose, no transporte a partir da fonte e na concentração de ortofosfato (Thorne e Koller, 1974). Os dados ora apresentados indicam que, além das alterações observadas em curto prazo na distribuição de fotossintatos entre os diferentes drenos, o metabolismo da fonte se ajusta às condições alteradas em experimentos de longa duração.

A taxa fotossintética (a quantidade líquida de carbono fixado por unidade de área foliar por unidade de tempo) muitas vezes aumenta por vários dias, quando aumenta a demanda do tecido dreno, e decresce, quando diminui a demanda deste tecido. A fotossíntese é mais fortemente inibida sob condições de demanda reduzida do dreno em plantas que preferencialmente armazenam amido, em vez de sacarose, durante o dia. Talvez um acúmulo de fotossintatos (amido, sacarose ou hexoses) na folha-fonte possa ser responsável pela ligação entre a demanda do dreno e a taxa fotossintética nas plantas com armazenamento de amido (ver Tópico 10.11 na Internet).

Sinais de longa distância podem coordenar as atividades das fontes e dos drenos

Além de apresentar como função principal o transporte de fotossintatos em longas distâncias, o floema é uma das vias de transporte para moléculas sinalizadoras de uma parte para outra do vegetal. Os sinais entre as fontes e os drenos podem ser físicos (como uma alta pressão de turgor) ou químicos (como hormônios vegetais e carboidratos). Os sinais indicando a mudança de turgor podem ser transmitidos rapidamente por meio do sistema interconectado dos elementos crivados.

Por exemplo, se o descarregamento do floema for rápido sob condições de rápida utilização de açúcar no tecido-dreno, as pressões de turgor nos elementos crivados dos drenos seriam reduzidas e esta redução seria transmitida às fontes. Se o carregamento fosse controlado em parte pelo turgor nos elementos crivados das fontes, haveria um aumento na resposta a este sinal dos drenos. A resposta contrária seria observada quando o descarregamento fosse lento nos drenos. Alguns dados sugerem que o turgor celular pode modificar a atividade da ATPase bombeadora de prótons na membrana plasmática e, portanto, alterar as taxas de transporte.

As partes aéreas produzem reguladores de crescimento como auxina (ver Capítulo 19), a qual pode ser rapidamente transportada para raízes pelo floema; as raízes, por sua vez, produzem citocininas (ver Capítulo 21), que se movem para a parte aérea através do xilema. As giberelinas (GA) e o ácido abscísico (ABA) (ver Capítulos 20 e 23) são também transportados por toda a planta no sistema vascular. Os hormônios vegetais desempenham um papel importante na regulação das relações fonte-dreno. Eles afetam a partição dos fotossintatos por controlarem o crescimento do dreno, a senescência foliar e outros processos do desenvolvimento.

O carregamento da sacarose na mamona é estimulado por auxina exógena, mas inibido por ABA, enquanto que o ABA exógeno promove e a auxina inibe a absorção de sacarose pelo tecido da raiz da beterraba. Os transportadores ativos na membrana plasmática são alvos óbvios para a regulação do carregamento e do descarregamento apoplástico pelos hormônios. Outros sítios potenciais da regulação hormonal do descarregamento incluem os transportadores do tonoplasto, as enzimas para o metabolismo da sacarose absorvida, a extensibilidade da parede celular e a permeabilidade dos plasmodesmas no caso do descarregamento simplástico (ver a próxima seção).

Como indicado anteriormente, os níveis de carboidratos podem influenciar a expressão de genes que codificam componentes da fotossíntese, assim como genes envolvidos na hidrólise da sacarose. Muitos genes têm sido caracterizados como apresentando resposta à redução e à abundância de açúcar (Koch, 1996). Assim, não apenas a sacarose é transportada no floema, como a sacarose e seus metabólitos podem atuar como sinais que modificam as atividades das fontes e dos drenos. Em beterraba, por exemplo, a atividade do transportador de sacarose-próton do tipo simporte diminui na membrana plasmática de vesículas isoladas de folhas-fonte, supridas com sacarose exógena pelo xilema.

A perda da atividade do transportador é acompanhada por um declínio no seu mRNA, sugerindo um efeito na transcrição ou na estabilidade do mRNA. Um modelo funcional inclui as seguintes etapas: (1) a diminuição da demanda do dreno leva a altos níveis de sacarose no sistema vascular; (2) altos níveis de sacarose levam a uma diminuição do transportador na fonte; (3) a diminuição do carregamento resulta no aumento da concentração de sacarose na fonte (Chiou e Bush, 1998). O aumento das concentrações de sacarose na fonte pode resultar em uma menor taxa fotossintética (ver Tópico 10.11 na Internet). Um aumento no acúmulo de amido nas folhas-fonte de plantas transformadas com DNA antisenso para o transportador de sacarose SUT1 também fornece suporte a esse modelo (Schulz e cols., 1998).

Em alguns sistemas fonte-dreno, os açúcares e outros metabólitos parecem interagir com sinais hormonais para o controle da expressão gênica (Thomas e Rodriguez, 1994).

Sinais de longa distância podem também regular o crescimento e o desenvolvimento vegetal

Sabe-se que os vírus podem se mover no floema, deslocando-se como complexos de proteínas e ácidos nucléicos ou como partículas virais intactas. Recentemente, moléculas endógenas de mRNA e proteínas foram encontradas na seiva do floema e algumas delas parecem ser moléculas sinalizadoras.

A via descrita a seguir parece estar aberta ao movimento de macromoléculas por longas distâncias: a partir das células companheiras das fontes para os elementos crivados-fontes, pela via até os elementos crivados-dreno, para as células companheiras-dreno e finalmente para as próprias células-dreno.

As proteínas sintetizadas nas células companheiras podem entrar nos elementos crivados pelos plasmodesmas que conectam os dois tipos celulares. Conforme mencionado, tanto o transportador SUT1 na membrana plasmática do elemento crivado quanto as proteínas-P da seiva de cucurbitáceas (PP1 e PP2) parecem ser sintetizados nas células companheiras. Os plasmodesmas que conectam as células companheiras e os elementos crivados devem, então, permitir o movimento dessas macromo-

léculas através deles. Partículas virais foram observadas nos plasmodesmas.

Algumas das proteínas que entram nos elementos crivados podem simplesmente se difundir através dos plasmodesmas para os elementos crivados, outras podem intermediar o seu próprio transporte célula a célula e outras, ainda, podem ser auxiliadas por proteínas específicas de controle (Mezitt e Lucas, 1996). O movimento passivo de proteínas das células companheiras para os elementos crivados foi demonstrado em plantas de *Arabidopsis* e de tabaco, transformadas com o gene da proteína verde fluorescente (GFP, do inglês, *Green Fluorescent Protein*) de água-viva, sob o controle do promotor SUC2 de *Arabidopsis*.

O transportador de sacarose-H^+ SUC2 do tipo simporte é sintetizado nas células companheiras, de modo que as proteínas expressadas sob o controle do promotor deste gene também são sintetizadas nessas células. A GFP, a qual é localizada por sua fluorescência após a excitação com a luz azul, se move por meio dos plasmodesmas das células companheiras nos elementos crivados e migra pelo floema até os tecidos-dreno. Visto que é improvável que a GFP da água-viva possua seqüências específicas para interação com as estruturas dos plasmodesmas, seu movimento nos elementos crivados deve ocorrer por difusão passiva (Imlau e cols., 1999).

Uma vez nos elementos crivados, algumas proteínas (p. ex., SUT1) são direcionadas à membrana plasmática ou a outras localizações celulares, enquanto outras proteínas movem-se na corrente de translocação para os tecidos-dreno. As proteínas que se movem no floema para os drenos incluem as proteínas-P PP1 e PP2. As subunidades das proteínas-P em pepino (*Cucumis sativus*) podem se mover através da união do enxerto a partir do porta-enxerto de pepino (a parte basal do enxerto) para a parte enxertada de abóbora (*Cucurbita maxima*) (parte superior do enxerto). Um experimento mostrou que a menor proteína PP2 é capaz de se mover dos elementos crivados para as células companheiras do caule enxertado; a maior proteína PP1 não foi detectada nas células companheiras. Nenhuma proteína foi capaz de se mover além do complexo elemento crivado-célula companheira (Golecki e cols., 1999). Tais proteínas podem ser muito grandes para passar pelos plasmodesmas que circundam o complexo elemento crivado-célula companheira ou podem faltar fatores de reconhecimento que permitam a interação com os plasmodesmas (Oparka e Santa Cruz, 2000). Por outro lado, a proteína verde fluorescente é descarregada pela via simplástica, pelos plasmodesmas, no tecido-dreno, como as testas de sementes, as anteras, os ápices de raízes e as células do mesofilo nas folhas importadoras (Imlau e cols., 1999).

Evidentemente, as proteínas podem ser transportadas das células companheiras da fonte para as células companheiras-dreno pelos elementos crivados. No entanto, existem poucas evidências de um movimento similar das proteínas sintetizadas fora das células companheiras. Outros sinais externos ao complexo elemento crivado-célula companheira podem resultar na produção de proteínas móveis nas células companheiras. Também há evidências para a translocação via floema de moléculas de mRNA que estão envolvidas no desenvolvimento dos tecidos-dreno (Oparka e Santa Cruz, 2000). Para ser determinada como molécula sinalizadora em plantas, uma macromolécula deve ser capaz de deixar o complexo elemento crivado-célula companheira no tecido-dreno e, talvez mais importante, deve ser capaz de modificar as funções de células específicas no dreno (Oparka e Santa Cruz, 2000). Tais demonstrações aguardam os resultados de futuras experimentações.

Os plasmodesmas podem exercer um controle dinâmico da difusão intercelular de pequenas moléculas (Lucas e cols., 1993; Baluska e cols., 2001). RNA e proteína também se movem de célula a célula através dos plasmodesmas. "Proteínas de movimento" codificadas por vírus interagem diretamente com os plasmodesmas para permitir a passagem dos ácidos nucléicos virais. As plantas de batata transformadas com a proteína de movimento do vírus do mosaico do tabaco mostraram padrões de translocação alterados nas folhas-fonte (Olesinski e cols., 1996), bem como padrões de partição modificados (Almon e cols., 1997). A modificação da alocação da folha-fonte depende da proteína de movimento ser expressa no mesofilo e nas células da bainha vascular ou no parênquima do floema e nas células companheiras.

Os plasmodesmas têm sido relacionados a praticamente todos os aspectos da translocação no floema, do carregamento e transporte de longa distância (lembrar que os poros nas áreas crivadas e placas crivadas são plasmodesmas modificados) à alocação e partição. Pesquisas futuras sobre a translocação do floema e sobre o papel dos plasmodesmas no crescimento e desenvolvimento vegetal irão, com certeza, progredir em conjunto.

RESUMO

A translocação no floema é o movimento dos produtos da fotossíntese de folhas maduras para as áreas de crescimento e reserva. O floema também redistribui água e vários outros compostos pelo corpo da planta.

Alguns aspectos da translocação do floema têm sido bem estabelecidos por extensas pesquisas em muitas áreas, incluindo:

- *A via de translocação.* Os açúcares e outros compostos orgânicos são conduzidos através da planta no floema, especificamente nas células denominadas elementos crivados. Tais elementos apresentam uma variedade de adaptações estruturais que os tornam aptos ao transporte.
- *Padrões de translocação.* Os materiais são translocados no floema a partir das fontes (áreas de suprimento de fotossintatos) para os drenos (áreas de metabolismo ou reserva de fotossintatos). As fontes são geralmente folhas maduras. Os drenos incluem órgãos como raízes, folhas imaturas e frutos.
- *Materiais translocados no floema.* Os solutos translocados são principalmente carboidratos, sendo a sacarose o açúcar mais comumente translocado. A seiva do floema também contém outras moléculas orgânicas, como aminoácidos, proteínas e hormônios vegetais, bem como íons inorgânicos.
- *Taxa de movimento.* As taxas de movimento no floema são bastante rápidas, muito além das taxas de difusão. A média de velocidade é de 1 m h^{-1} e as taxas de transferência de massa variam de 1 a 15 g h^{-1} cm^{-2} dos elementos crivados.

Outros aspectos da translocação do floema necessitam de investigação adicional e a maioria deles está sendo estudada intensivamente. Tais aspectos incluem:

- *Carregamento e descarregamento do floema.* O transporte de açúcares para dentro e para fora dos elementos crivados é chamado de carregamento e de descarregamento, respectiva-

mente. Em algumas espécies, os açúcares devem entrar no apoplasto da folha-fonte antes do carregamento. Nessas plantas, o carregamento nos elementos crivados requer energia metabólica, fornecida a partir de um gradiente de prótons. Em outras espécies, a via completa a partir das células fotossintetizantes até os elementos crivados ocorre no simplasto da folha-fonte. Em ambos os casos, o carregamento do floema é específico para o açúcar transportado. O descarregamento do floema necessita de energia metabólica, mas a rota de transporte, o local do metabolismo dos açúcares transportados e o local onde a energia é gasta varia de acordo com o órgão ou a espécie.

- *Mecanismos de translocação.* O fluxo de pressão é aceito como o mecanismo mais provável de translocação no floema. Nesse modelo, o fluxo de massa da seiva do floema ocorre em resposta a um gradiente de pressão gerado osmoticamente. Vários dados estruturais e fisiológicos indicam que os materiais são translocados no floema das angiospermas por fluxo de pressão. O mecanismo de translocação nas gimnospermas requer investigações adicionais.
- *Alocação e partição de fotossintatos.* A alocação é a regulação das quantidades de carbono fixado canalizadas para várias rotas metabólicas. Nas fontes, os mecanismos reguladores da alocação determinam as quantidades de carbono fixado que serão armazenadas (normalmente como amido), metabolizadas nas células da fonte ou imediatamente transportadas para os tecidos-dreno. Nos drenos, os açúcares transportados são alocados para os processos de crescimento ou reserva. A partição é a distribuição diferencial de fotossintatos na planta como um todo. Os mecanismos de partição determinam as quantidades de carbono fixado distribuídas nos tecidos-dreno específicos. O carregamento e o descarregamento do floema, a alocação e a partição dos fotossintatos são de grande interesse científico devido aos seus papéis na produtividade de plantas cultivadas.

Material da Internet

Tópicos da Internet

10.1 Estudos clássicos no transporte do floema
Experimentos clássicos mostram algumas das propriedades básicas do floema.

10.2 Amostrando a seiva do floema
Estiletes de afídios são adequados para amostrar a seiva do floema.

10.3 Transporte de nitrogênio em soja
Os compostos nitrogenados sintetizados nas raízes são transferidos do xilema para o floema.

10.4 Monitorando o trânsito na "estrada" de açúcar
As taxas do transporte de açúcar no floema são medidas com marcadores radioativos.

10.5 Evidência para o carregamento apoplástico dos elementos crivados
As plantas transgênicas têm fornecido suporte experimental para o carregamento apoplástico.

10.6 Algumas substâncias entram no floema por difusão
Substâncias, como os hormônios vegetais, podem entrar no floema por difusão.

10.7 Localização do transportador de sacarose-H^+ do tipo simporte no floema de carregadores apoplásticos
O transportador de sacarose-H^+ do tipo simporte das células companheiras tem sido localizado usando corantes fluorescentes.

10.8 Evidência fisiológica para a continuidade simplástica nas folhas-fonte
Corantes fluorescentes também têm sido usados para mostrar a continuidade simplástica nas folhas-fonte.

10.9 Açúcares no floema
O transporte, a alocação e o metabolismo de açúcares do floema são altamente regulados.

10.10 Os requerimentos energéticos para o descarregamento em sementes em desenvolvimento e órgãos de reserva
O descarregamento dos açúcares de reserva de sementes no embrião é mediado por transportadores ativos.

10.11 Os possíveis mecanismos de ligação entre a demanda do dreno e a taxa fotossintética nos armazenadores de amido
O acúmulo de fotossintatos aumenta a demanda do dreno.

Referências bibliográficas

Almon, E., Horowit, M., Wang, H.-L., Lucas, W. J., Zamski, E., and Wolf, S. (1997) Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* 115: 1599-1607.

Baluska, F, Cvrckova, F, Kendrick-Jones, J., and Volkmann, D. (2001) Sink plasmodesmata as gateways for phloem unloading. Myosin VIII and calreticulin as molecular determinants of sink strength? *Plant Physiol.* 126: 39-16.

Barker, L., Kuehn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Himer, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J. M., and Frommer, W. B. (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell* 12:1153-1164.

Bostwick, D. E., Dannenhoffer, J. M., Skaggs, M. L, Lister, R. M., Larkins, B. A., and Thompson, G. A. (1992) Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells. *Plant Cell* 4:1539-1548.

Bouche-Pillon, S., Fleurat-Lessard, P, Fromont, J.-C., Serrano, R., and Bonnemain, J.-L. (1994) Immunolocalization of the plasma membrane H^+-ATPase in minor veins of *Vicia faba* in relation to phloem loading. *Plant Physiol.* 105: 691-697.

Brentwood, B., and Cronshaw, J. (1978) Cytochemical localization of adenosine triphosphatase in the phloem of *Pisum sativum* and its relation to the function of transfer cells. *Planta* 140: 111-120.

Chiou, T.-J., and Bush, D. R. (1998) Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:4784-4788.

Clark, A. M., Jacobsen, K. R., Bostwick, D. E., Dannenhoffer, J. M., Skaggs, M. L, and Thompson, G. A. (1997) Molecular characterization of a phloem-specific gene encoding the filament protein, phloem protein 1 (PP1), from *Cucurbita maxima*. *Plant J.* 12: 49-61.

DeWitt, N. D., and Sussman, M. R. (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H^+-ATPase) in phloem companion cells. *Plant Cell* 7:2053-2067.

Eschrich, W. (1975) Bidirectional transport. In *Transport in Plants, 1: Phloem Transport* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 1), M. H. Zimmermann and J. A. Milburn, eds., Springer, New York, pp. 245-255.

Evert, R. F. (1982) Sieve-tube structure in relation to function. *BioScience* 32: 789-795.

Evert, R. E, and Mierzwa, R. J. (1985) Pathway(s) of assimilate movement from mesophyll cells to sieve tubes in the *Beta vulgaris* leaf. In *Phloem Transport. Proceedings of an International Conference on Phloem Transport, Asilomar, CA*, J. Cronshaw, W. J. Lucas, and R. T. Giaquinta, eds. Liss, New York, pp. 419-432.

Fisher, D. B. (1978) An evaluation of the Munch hypothesis for phloem transport in soybean. *Planta* 139: 25-28.

Flora, L. L., and Madore, M. A. (1996) Significance of minor-vein anatomy to carbohydrate transport. *Planta* 198: 171-178.

Fondy, B. R. (1975) Sugar selectivity of phloem loading in *Beta vulgaris, vulgaris* L. and *Fraxinus americanus, americana* L. Thesis, University of Dayton, Dayton, OH.

Fondy, B. R., and Geiger, D. R. (1980) Effect of rapid changes in sink-source ratio, on export and distribution of products of photosynthesis in leaves of *Beta vulgaris L.* and *Phaseolus vulgaris L. Plant Physiol.* 66: 945-949.

Geiger, D. R., and Servaites, J. C. (1994) Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 23,-256.

Geiger, D. R., and Sovonick, S. A. (1975) Effects of temperature, anoxia and other metabolic inhibitors on translocation. In *Transport in Plants, 1: Phloem Transport* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 1), M. H. Zimmerman and J. A. Milburn, eds., Springer, New York, pp. 256-286.

Geiger, D. R., Giaquinta, R. T., Sovonick, S. A., and Fellows, R. J. (1973) Solute distribution in sugar beet leaves in relation to phloem loading and translocation. *Plant Physiol.* 52:585-589.

Geiger, D. R., Shieh, W.-J., and Yu, X.-M. (1995) Photosynthetic carbon metabolism and translocation in wild-type and starch-deficient mutant *Nicotiana sylvestris* L. *Plant Physiol.* 107: 507-514.

Giaquinta, R. T., and Geiger, D. R. (1977) Mechanism of cyanide inhibition of phloem translocation. *Plant Physiol.* 59:178-180.

Goggin, F L., Medville, R., and Turgeon, R. (2001) Phloem loading in the tulip tree. Mechanisms and evolutionary implications. *Plant Physiol.* 124: 891-899.

Golecki, B., Schulz, A., and Thompson, G. A. (1999) Translocation of structural P proteins in the phloem. *Plant Cell* 11: 127-140.

Grusak, M. A., Beebe, D. U., and Turgeon, R. (1996) Phloem loading. In *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source-Sink Relationships*, E. Zamski and A. A. Schaffer, eels., Dekker, New York, pp. 209-227.

Hall, S. M., and Baker, D. A. (1972) The chemical composition of *Ricinus* phloem exudate. *Planta* 106: 131-140.

Ixnlau, A., Truernit, E., and Sauer, N. (1999) Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* 11: 309-322.

Jeuffory, M.-H., and Warembourg, F R. (1991) Carbon transfer and partitioning between vegetative and reproductive organs in *Pisum sativum L. Plant Physiol.* 97: 440-148.

Joy, K. W. (1964) Translocation in sugar beet. 1. Assimilation of $14CO_2$ and distribution of materials from leaves. *J. Exp. Bot.* 15: 485-494.

Knoblauch, M., and Van Bel, A. J. E. (1998) Sieve tubes in action. *Plant Cell* 10: 35-50.

Koch, K. E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.

Koch, K. E., Tsui, C.-L., Schrader, L. E., and Nelson, O. E. (1982) Source-sink relations in maize mutants with starch deficient endosperms. *Plant Physiol.* 70: 322-325.

Koch, K. E., Wu, Y., and Xu, J. (1996) Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: Potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *J. Exp. Bot.* 47 (special issue): 1179-1185.

Kuehn, C., Franceschi, V R., Schulz, A., Lemoine, R., and Frommer, W. B. (1997) Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275: 1298-1300.

Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B., and Ward, J. M. (1999) The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.

Langhans, M., Ratajczak, R., Luetzelschwab, M., Michalke, W., Waechter, R., Fischer-Schliebs, E., and Ullrich, C. 1. (2001) Immunolocalization of plasma-membrane H^+-ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L. *Planta* 213:11-19.

Lucas, W. J., Ding, B., and Van der Schoot, C. (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.* 125: 435-476.

Mezitt, L. A., and Lucas, W. J. (1996) Plasmodesmal cell-to-cell transport of proteins and nucleic acids. *Plant Mol. Biol.* 32: 251-273.

Munch, E. (1930) *Die Stoffbewegungen in der Pflanze.* Gustav Fischer, Jena, Germany.

Nobel, P S. (1991) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology.* Academic Press, San Diego, CA.

Olesinski, A. A., Almon, E., Navot, N., Perl, A., Galun, E., Lucas, W. J., and Wolf, S. (1996) Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* 111: 541-550.

Oparka, K. J., and Santa Cruz, S. (2000) The great escape: Phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mal. Biol.* 51: 323-347.

Oparka, K. J., and van Bel, A. J. E. (1992) Pathways of pldoem loading and unloading: a plea for a uniform terminology. In *Carbon Partitioning within and between Organisms*, C. J. Pollock, J. F. Farrar, and A. J. Gordon, eds., BIOS Scientific, Oxford, pp. 249-254.

Preiss, J. (1982) Regulation of the biosynthesis and degradation of starch. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33: 431-154.

Roberts, A. G., Santa Cruz, S., Roberts, L. M., Prior, D. A. M., Turgeon, R., and Oparka, K. J. (1997) Phloem unloading in sink leaves of *Nicohana benthamiana:* Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* 9: 1381-1396.

Schobert, C., Grossmann, P, Gottschalk, M., Komor, E., Pecsvaradi, A., and zur Nieden, U. (1995) Sieve-tube exudate from *Ricinus communis* L. seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* 196: 20,5-210.

Schulz, A. (1990) Conifers. In *Sieve Elements: Comparative Structure, Induction and Development.* H.-D. Behnke and R. D. Sjolund, eds. Springer-Verlag, Berlin.

Schulz, A. (1992) Living sieve cells of conifers as visualized by confocal, laser-scanning fluorescence microscopy. *Protoplasma* 166: 153-164.

Schulz, A. (1994) Phloem transport and differential unloading in pea seedlings after source and sink manipulations. *Planta* 192: 239-248.

Schulz, A., Kuhn, C., Riesmeier, J. W., and Frommer, W. B. (1998) Ultrastructural effects in potato leaves due to antisense-inhibition of the sucrose transporter indicate an apoplasmic mode of phloem loading. *Planta* 206: 533-543.

Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrtz, M., and Sauer, N. (1995) Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7:1545-1554.

Thomas, B. R., and Rodriguez, R. L. (1994) Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol.* 106:1235-1239.

Thorne, J. H., and Koller, H. R. (1974) Influence of assimilate demand on photosynthesis, diffusive resistances, translocation, and carbohydrate levels of soybean leaves. *Plant Physiol.* 54: 201-207.

Truernit, E., and Sauer, N. (1995) The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose-H^+ symporter gene directs expression of β-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta* 196: 564-570.

Turgeon, R. (1984) Termination of nutrient import and development of vein loading capacity in albino tobacco leaves. *Plant Physiol.* 76:45-48.

Turgeon, R., and Gowan, E. (1990) Phloem loading in *Coleus blumei* in the absence of carrier-mediated uptake of export sugar from the apoplast. *Plant Physiol.* 94: 1244-1249.

Turgeon, R., and Webb, J. A. (1973) Leaf development and phloem transport in *Cucurbita pepo:* Transition from import to export. *Planta* 113: 179-191.

Turgeon, R., Beebe, D. U., and Gowan, E. (1993) The intermediary cell: Minor-vein anatomy and raffinose oligosaccharide synthesis in the Scrophulariaceae. *Planta* 191: 446-456.

Capítulo

11 Respiração e metabolismo de lipídeos

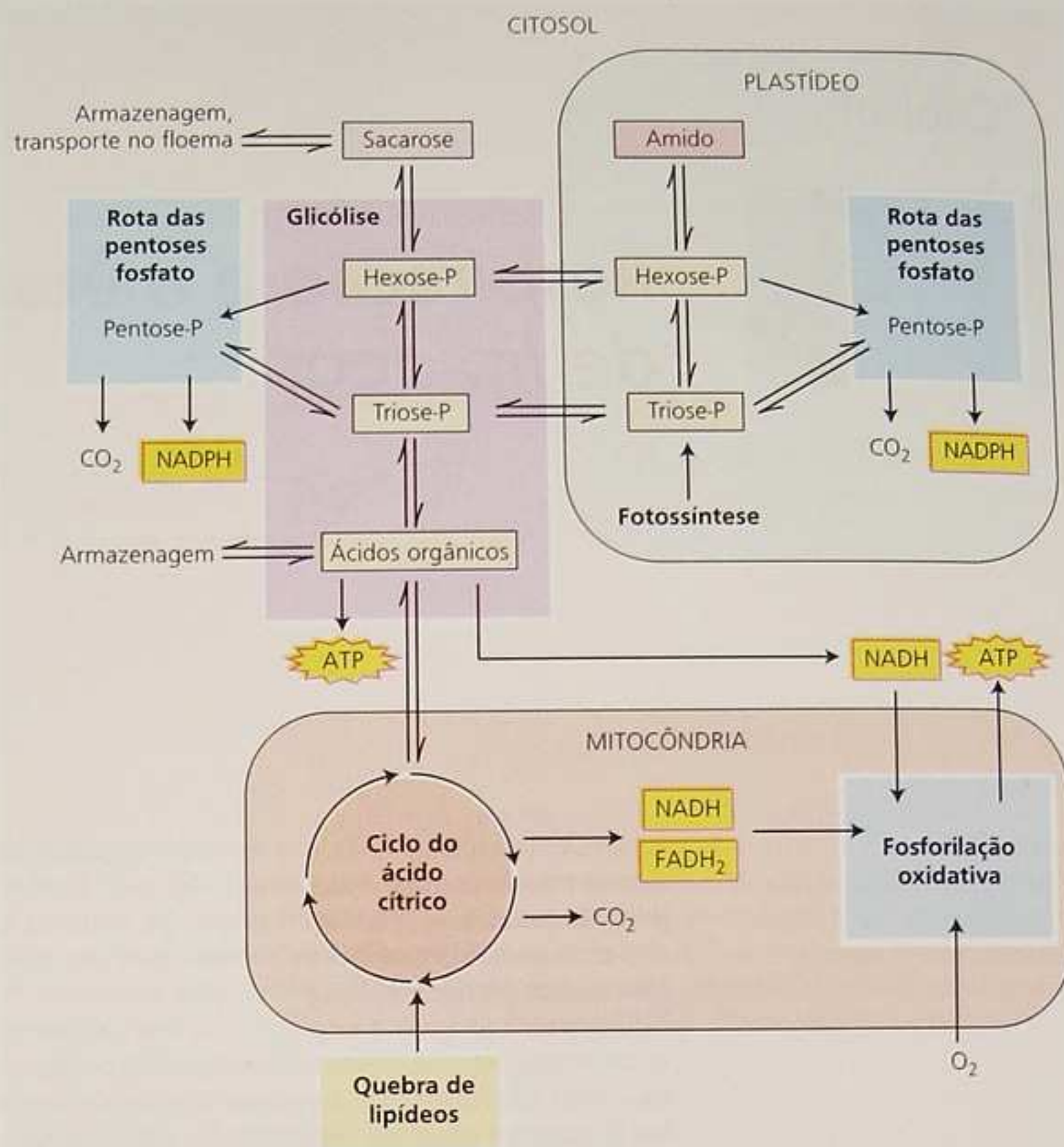
A FOTOSSÍNTESE FORNECE as unidades orgânicas básicas das quais dependem as plantas (e quase todos os tipos de vida). Com seu metabolismo de carbono associado, a respiração libera, de maneira controlada, a energia armazenada nos compostos de carbono para uso celular. Ao mesmo tempo, gera muitos precursores de carbono para biossíntese. Na primeira parte deste capítulo, será revisada a respiração em seu contexto metabólico, enfatizando as interconexões e as características especiais peculiares às plantas. A respiração estará relacionada aos progressos recentes na compreensão que se tem sobre bioquímica e biologia molecular das mitocôndrias vegetais.

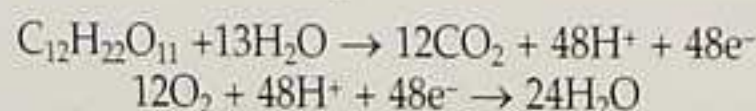
Na segunda parte do capítulo, serão descritas as rotas da biossíntese de lipídeos que levam à acumulação de gorduras e de óleos, usados na armazenagem de muitas plantas. Igualmente será examinada a síntese de lipídeos e a sua influência sobre as propriedades das membranas. Finalmente, serão discutidas as rotas catabólicas envolvidas na quebra de lipídeos e na conversão dos produtos da degradação a açúcares, que ocorre durante a germinação de sementes.

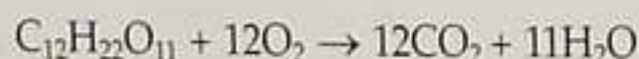
VISÃO GERAL DA RESPIRAÇÃO VEGETAL

A respiração aeróbica (que exige oxigênio) é comum a quase todos os organismos eucarióticos, e, em linhas gerais, o processo respiratório em plantas é similar àquele encontrado em animais e eucarióticos inferiores. No entanto, alguns aspectos específicos da respiração vegetal distinguem-na da sua equivalente animal. **Respiração aeróbica** é o processo biológico pelo qual compostos orgânicos reduzidos são mobilizados e subseqüentemente oxidados de maneira controlada. Durante a respiração, a energia livre é liberada e transitoriamente armazenada em um composto, ATP, o qual pode ser prontamente utilizado para a manutenção e o desenvolvimento da planta.

A glicose é comumente citada como substrato para a respiração. Contudo, em uma célula vegetal em funcionamento, o carbono reduzido é derivado de fontes como o dissacarídeo sacarose, hexoses fosfato e trioses fosfato provenientes da degradação do amido e da fotossíntese; ele pode ser derivado também de polímeros contendo frutose (frutanas) e outros açúcares, assim como de lipídeos (principalmente triacilgliceróis), de ácidos orgânicos e, ocasionalmente, de proteínas (Figura 11.1).

FIGURA 11.1 Visão geral da respiração. Os substratos para a respiração são gerados por outros processos celulares e entram nas rotas respiratórias. As rotas da glicólise e das pentoses fosfato no citosol e o plastídeo convertem açúcares em ácidos orgânicos, via hexoses fosfato e trioses fosfato, gerando NADH ou NADPH e ATP. Os ácidos orgânicos são oxidados no ciclo mitocondrial do ácido cítrico; NADH e FADH2 produzidos fornecem a energia para a síntese de ATP pela cadeia de transporte de elétrons e ATP sintase na fosforilação oxidativa. Na gluconeogênese, o carbono oriundo da quebra de lipídeos é degradado nos glioxissomos, metabolizado no ciclo do ácido cítrico e, então, utilizado para sintetizar açúcares no citosol por glicólise reversa.

Do ponto de vista químico, a respiração vegetal pode ser expressa como a oxidação da molécula de 12 carbonos sacarose e a redução de 12 moléculas de O_2:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 13H_2O \rightarrow 12CO_2 + 48H^+ + 48e^-$$
$$12O_2 + 48H^+ + 48e^- \rightarrow 24H_2O$$

resultando na seguinte reação líquida:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O$$

Esta reação é a inversão do processo fotossintético; ela representa uma reação redox acoplada na qual a sacarose é completamente oxidada a CO_2, enquanto o oxigênio serve como aceptor final de elétrons, sendo reduzido à água. O decréscimo-padrão na energia livre para a reação, da forma em que está escrita, é 5.760 kJ (1.380 kcal) por mole (342 g) de sacarose oxidada. A liberação controlada desta energia livre, juntamente com o seu acoplamento à síntese de ATP, é a principal função do metabolismo respiratório

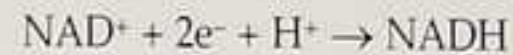
Para impedir o dano (incineração) de estruturas celulares, a célula mobiliza a grande quantidade de energia livre liberada na oxidação da sacarose em uma série de reações passo a passo. Tais reações podem ser agrupadas em quatro processos principais: glicólise, ciclo do ácido cítrico, reações da rota das pentoses fosfato e fosforilação oxidativa. Os substratos para a respiração entram no processo respiratório em diferentes pontos das rotas, conforme resumido na Figura 11.1.

- A **glicólise** envolve uma série de reações executadas por um grupo de enzimas solúveis localizadas tanto no citosol quanto no plastídeo. Um açúcar, por exemplo a sacarose, é parcialmente oxidado via açúcares fosfato de seis carbonos (hexose fosfato) e açúcares fosfato de três carbonos (trioses fosfato), para produzir um ácido orgânico — por exemplo, piruvato. O processo rende uma pequena quantidade energia como ATP e poder redutor sob forma do nucleotídeo piridina reduzido, NADH.

- Na **rota das pentoses fosfato,** também localizada tanto no citosol quanto no plastídeo, a glicose-6-fosfato de seis carbonos é inicialmente oxidada a ribulose-5-fosfato de cinco carbonos. O carbono é perdido como CO_2, e o poder redutor, conservado na forma de duas moléculas de um outro nucleotídeo piridina reduzido, NADPH. Nas reações seguintes, próximas ao equilíbrio, a ribulose-5-fosfato é convertida em açúcares de três a sete carbonos.

- No **ciclo do ácido cítrico**, o piruvato é completamente oxidado a CO_2 e neste processo é gerada uma quantidade considerável de poder redutor (16 NADH + 4 $FADH_2$ equivalentes por sacarose). Com uma exceção (sucinato desidrogenase), estas reações envolvem uma série de enzimas localizadas no compartimento aquoso interno, ou matriz, das mitocôndrias (ver Figura 11.5). Conforme será discutido mais tarde, a sucinato desidrogenase está localizada na membrana mitocondrial interna.
- Na fosforilação oxidativa, os elétrons são transferidos ao longo de uma **cadeia de transporte de elétrons**, que consiste de um conjunto de proteínas de transporte de elétrons ligadas à membrana mitocondrial interna. Tal sistema transfere elétrons do NADH (e espécies relacionadas) — produzidos durante a glicólise, a rota das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico — ao oxigênio. Esta transferência de elétrons libera uma grande quantidade de energia livre, muita da qual é conservada por meio da síntese de ATP a partir de ADP e P_i (fosfato inorgânico), catalisada pela enzima **ATP sintase**. Coletivamente, as reações redox da cadeia de transporte de elétrons e a síntese de ATP são chamadas de **fosforilação oxidativa**. Este estágio final completa a oxidação da sacarose.

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+/NADH) é um co-fator orgânico (co-enzima) associado a muitas enzimas que catalisam reações redox celulares. O NAD^+ é a forma oxidada do co-fator e ele sofre uma reação reversível envolvendo dois elétrons que produz NADH (Figura 11.2):

$$NAD^+ + 2e^- + H^+ \rightarrow NADH$$

O potencial de redução-padrão para este par redox é de cerca de –320 mV, o que o faz um redutor relativamente forte (i. é, um doador de elétrons). O NADH, portanto, é uma boa molécula na

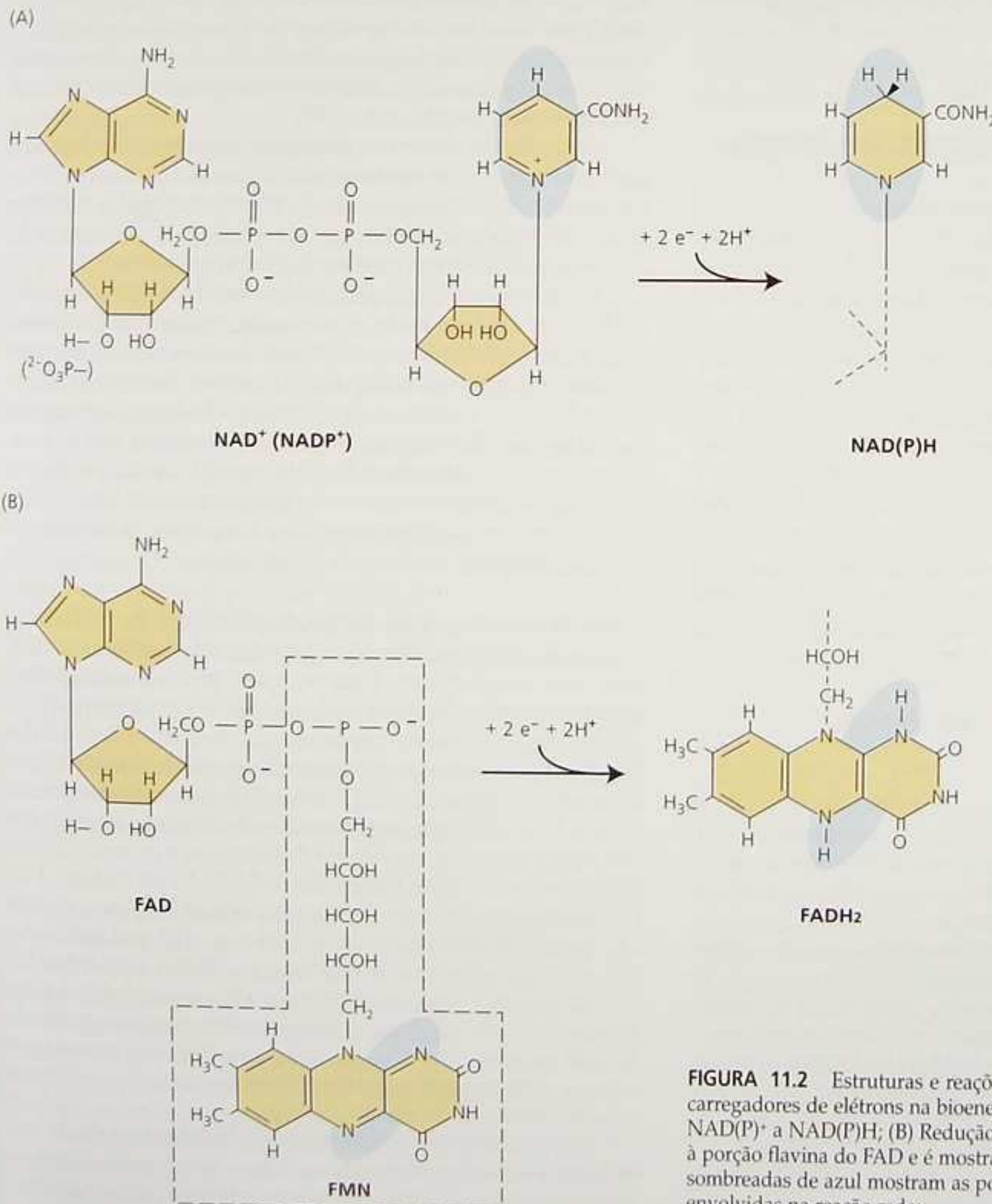
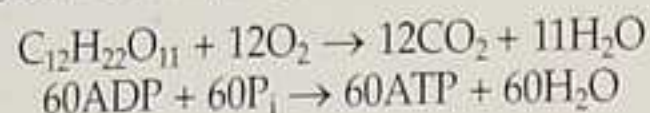



FIGURA 11.2 Estruturas e reações dos principais co-fatores carregadores de elétrons na bioenergética respiratória. (A) Redução do $NAD(P)^+$ a NAD(P)H; (B) Redução do FAD a FADH2. O FMN é idêntico à porção flavina do FAD e é mostrado na caixa tracejada. As áreas sombreadas de azul mostram as porções das moléculas que estão envolvidas na reação redox.

qual conservar a energia livre carregada pelos elétrons liberados durante as oxidações passo a passo da glicólise e do ciclo do ácido cítrico. Um composto relacionado, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato ($NADP^+/NADPH$), funciona em reações redox da fotossíntese (ver Capítulo 8) e da rota oxidativa das pentoses fosfato; ele também participa do metabolismo mitocondrial (Møller e Rasmusson, 1998). Este assunto será discutido mais tarde neste capítulo.

A oxidação do NADH pelo oxigênio via cadeia de transporte de elétrons libera energia livre (220 kJ mol^{-1} ou 52 kcal mol^{-1}) que governa a síntese de ATP. É possível elaborar agora um quadro mais complexo da respiração, relacionado ao seu papel no metabolismo energético celular, acoplando as duas reações que seguem:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O$$
$$60ADP + 60P_i \rightarrow 60ATP + 60H_2O$$

Deve ser lembrado que nem todo carbono que entra na rota respiratória termina como CO_2. Muitos intermediários da respiração são o ponto de partida para rotas que assimilam nitrogênio na forma orgânica, rotas que sintetizam nucleotídeos e lipídeos e muitas outras (ver Figura 11.13).

GLICÓLISE: UM PROCESSO CITOSÓLICO E PLASTÍDICO

Nas etapas inicias da glicólise (das palavras gregas *glycos*, "açúcar", e *lysis*, "quebra"), os carboidratos são convertidos a hexoses fosfato, que são então quebradas em duas trioses fosfato. Em uma fase subseqüente, conservadora de energia, as trioses fosfato são oxidadas e rearranjadas, sendo produzidas duas moléculas de piruvato, um ácido orgânico. Além de preparar o substrato para a oxidação no ciclo do ácido cítrico, a glicólise produz uma pequena quantidade de energia química sob forma de ATP e de NADH.

Quando o oxigênio molecular não está disponível — por exemplo, em raízes vegetais em solos alagados — a glicólise pode ser a fonte principal de energia para as células. Para esta tarefa, as **rotas fermentativas**, que estão localizadas no citosol, reduzem o piruvato para reciclar o NADH produzido na glicólise. Nesta seção, serão descritas as rotas glicolíticas e fermentativas básicas, enfatizando as características específicas para as células vegetais. No final, será discutida a rota das pentoses fosfato.

A glicólise converte carboidratos em piruvato, produzindo NADH e ATP

A glicólise ocorre em todos os organimos vivos (procariontes e eucariontes). As principais reações associadas às rotas glicolítica e fermentativa clássicas em plantas são quase idênticas àquelas de células animais (Figura 11.3). No entanto, a glicólise em plantas tem características reguladoras singulares, assim como uma rota glicolítica parcial paralela em plastídeos e rotas enzimáticas alternativas para várias etapas citosólicas. Em animais, o substrato para a glicólise é a glicose, e o produto final, o piruvato. Uma vez que na maioria das plantas a sacarose é o principal açúcar translocado e, portanto, a forma de carbono que a maioria dos tecidos não-fotossintéticos importa, ela (e não a glicose) pode ser considerada como o verdadeiro substrato de açúcar para a respiração vegetal. Os produtos finais da glicólise vegetal incluem um outro ácido orgânico, o malato.

Nas etapas iniciais da glicólise, a sacarose é decomposta nos dois monossacarídeos — glicose e frutose — que podem prontamente ingressar na rota glicolítica. São conhecidas duas rotas para a degradação da sacarose em plantas, sendo que ambas participam do descarregamento deste açúcar do floema (ver Capítulo 10).

Na maioria dos tecidos vegetais, a sacarose sintase, localizada no citosol, é usada para degradar sacarose, combinando sacarose com UDP para produzir frutose e UDP-glicose. A UDP-glicose fosforilase, então, converte UDP-glicose e pirofostafo (PP_i) em UTP e glicose-6-fosfato (ver Figura 11.3). Em alguns tecidos, invertases presentes na parede celular, no vacúolo ou no citosol hidrolisam a sacarose em suas duas hexoses componentes (glicose e frutose). As hexoses são, então, fosforiladas em uma reação que utiliza ATP. Enquanto a reação da sacarose sintase aproxima-se do equilíbrio, a reação da invertase libera energia suficiente para ser essencialmente irreversível.

Os plastídeos, como cloroplastos ou amiloplastos (ver Capítulo 1), também podem fornecer substratos para a glicólise. O amido é sintetizado e catabolizado somente em plastídeos (ver Capítulo 8) e o carbono obtido da degradação do amido entra na rota glicolítica no citosol primariamente como hexose fosfato (que é translocada para fora dos amiloplastos) ou triose fosfato (a qual é translocada para fora dos cloroplastos). Os produtos fotossintéticos também podem entrar diretamente na rota glicolítica como triose fosfato (Hoefnagel e cols., 1998).

Os plastídeos convertem amido em trioses fosfato usando um conjunto separado de isozimas glicolíticas, que convertem hexoses fosfato a trioses fosfato. Todas as enzimas mostradas na Figura 11.3 foram encontradas em níveis suficientes para sustentar as taxas de respiração observadas em tecidos vegetais intactos.

Na fase inicial da glicólise, cada unidade de glicose é fosforilada duas vezes e, então, é quebrada, produzindo finalmente duas moléculas de triose fosfato. Esta série de reações consome de duas a quatro moléculas de ATP por unidade de sacarose, dependendo de a sacarose ser quebrada pela sacarose sintase ou pela invertase. Tais reações também incluem duas das três reações essencialmente irreversíveis da rota glicolítica, que são catalisadas por hexoquinase e fosfofrutoquinase (ver Figura 11.3). A reação da fosfofrutoquinase é um dos pontos de controle da glicólise, tanto em plantas quanto em animais.

A fase de conservação de energia da glicólise. As reações discutidas até agora transferem carbono dos diversos *pools* de substrato para trioses fosfato. Uma vez que o gliceraldeído-3-fosfato é formado, a rota glicolítica pode começar a extrair energia utilizável na fase de conservação de energia. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase catalisa a oxidação do aldeído a um ácido carboxílico, reduzindo NAD^+ a NADH. Tal reação desprende energia livre suficiente para permitir a fosforilação (usando fosfato inorgânico) do gliceraldeído-3-fosfato, para produzir 1,3-bisfosfoglicerato. O ácido carboxílico fosforilado no carbono 1 do 1,3-bisfosfoglicerato (ver Figura 11.3) tem uma grande energia livre padrão de hidrólise (–49,3 kJ mol^{-1} ou –11,8 kcal mol^{-1}). Assim, o 1,3-bisfosfoglicerato é um forte doador de grupos fosfato.

Na próxima etapa da glicólise, catalisada pela fosfoglicerato quinase, o fosfato no carbono 1 é transferido para uma molécula de ADP, produzindo ATP e 3-fosfoglicerato. Para cada sacarose que entra na rota são gerados quatro ATPs por esta reação — um para cada molécula de 1,3-bisfosfoglicerato.

Este tipo de síntese de ATP, tradicionalmente denominada **fosforilação em nível de substrato**, envolve a transferência direta de um grupo fosfato de uma molécula de substrato para o ADP, for-

mando ATP. Como será visto, a síntese de ATP por fosforilação em nível de substrato tem mecanismo distinto da síntese de ATP pelas ATP sintases envolvidas na fosforilação oxidativa em mitocôndrias (que se descreverá mais tarde neste capítulo) ou na fotofosforilação em cloroplastos (Capítulo 7).

Nas duas reações seguintes, o fosfato no 3-fosfoglicerato é transferido para o carbono 2 e, então, uma molécula de água é removida, produzindo o composto fosfoenolpiruvato (PEP). O grupo fosfato no PEP tem uma alta energia livre padrão de hidrólise (–61,9 kJ mol^{-1} ou 14,8 kcal mol^{-1}), o que faz do PEP um doador de fosfato extremamente adequado para a formação de ATP. Usando PEP como substrato, a enzima piruvato quinase catalisa uma segunda fosforilação em nível de substrato, para produzir ATP e piruvato. Esta etapa final, que é o terceiro passo essencialmente irreversível na glicólise, produz quatro moléculas adicionais de ATP para cada sacarose que ingressa na rota.

As plantas têm reações glicolíticas alternativas

A seqüência de reações, que leva à formação de piruvato a partir da glicose, ocorre em todos os organismos que realizam glicólise. Ademais, os organismos podem operar esta rota na direção inversa, para sintetizar açúcar a partir de ácidos orgânicos, processo conhecido como **gliconeogênese**.

A gliconeogênese não é comum em plantas, mas opera em sementes de algumas espécies, como mamona e girassol, que armazenam uma quantidade expressiva de suas reservas de carbono sob forma de óleos (triacilgliceróis). Depois que a semente germina, por gliconeogênese, a maior parte do óleo é convertida a sacarose, que é, então, utilizada para sustentar o crescimento da plântula. Na fase inicial da glicólise, a gliconeogênese sobrepõe-se à rota de síntese da sacarose, a partir da triose fosfato fotossintética descrita no Capítulo 8, que é típica para plantas.

Como a reação glicolítica catalisada pela fosfofrutoquinase ATP-dependente é essencialmente irreversível (ver Figura 11.3), uma enzima adicional, frutose-1,6-bifosfatase, converte frutose-1,6-bifosfato a frutose-6-fosfato e P_i durante a gliconeogênese. A fosfofrutoquinase ATP-dependente e a frutose-1,6-bifosfatase representam um importante ponto de controle do fluxo de carbono por intermédio das rotas glicolítica/gliconeogênica, tanto em plantas quanto em animais, assim como na síntese de sacarose em plantas (ver Capítulo 8).

Em plantas, a interconversão da frutose-6-fosfato e da frutose-1,6-bifosfato torna-se mais complexa, devido à presença de uma enzima (citosólica) adicional, uma fosfofrutoquinase PP_i–dependente (pirofosfato:frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase), que catalisa a seguinte reação reversível (ver Figura 11.3):

$$\text{Frutose-6-P} + PP_i \leftrightarrow \text{frutose-1,6-}P_2 + P_i$$

onde P representa fosfato e P_2, bifosfato. A fosfofrutoquinase PP_i-dependente é encontrada no citosol da maioria dos tecidos vegetais em níveis que são consideravelmente mais altos do que aqueles da fosfofrutoquinase ATP-dependente (Kruger, 1997). A supressão da fosfofrutoquinase PP_i-dependente em batata transgênica mostrou que ela contribui para o fluxo glicolítico, embora não seja essencial para a sobrevivência da planta, indicando que outras enzimas podem assumir sua função.

A reação catalisada pela fosfofrutoquinase PP_i-dependente é prontamente reversível, mas é pouco provável que opere na síntese de sacarose (Dennis e Blakely, 2000). Tal como a fosfofrutoquinase ATP-dependente e a frutose-1,6-bifosfatase, esta enzima parece ser regulada por flutuações no metabolismo celular (discutidas mais adiante neste capítulo), sugerindo que, sob determinadas circunstâncias, o funcionamento da rota glicolítica em plantas difere daquele que ocorre em muitos outros organismos (ver **Ensaio 11.1 na Internet**).

No final da seqüência glicolítica, as plantas têm rotas alternativas para metabolizar o PEP. Em uma rota, o PEP é carboxilado pela enzima citosólica de ocorrência generalizada, PEP carboxilase, para formar o ácido orgânico oxaloacetato (OAA). O OAA é, então, reduzido a malato pela ação da malato desidrogenase, que emprega o NADH como fonte de elétrons, desempenhando um papel similar àquele das desidrogenases durante o metabolismo fermentativo (ver Figura 11.3). O malato resultante pode ser armazenado por meio do transporte ao vacúolo ou transportado à mitocôndria, onde pode ingressar no ciclo do ácido cítrico. Assim, a operação da piruvato quinase e da PEP carboxilase pode produzir ácidos orgânicos alternativos — piruvato ou malato — para a respiração mitocondrial, embora o piruvato predomine na maioria dos tecidos.

Na ausência de O_2, a fermentação regenera o NAD^+ necessário para a glicólise

Na ausência de oxigênio, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa não podem funcionar. Assim, a glicólise não pode continuar a operar porque o suprimento celular de NAD^+ é limitado e, uma vez que todo o NAD^+ fica aprisionado no estado reduzido (NADH), a reação catalisada pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase não pode ocorrer. Para superar o problema, as plantas e outros organismos podem prosseguir na metabolização do piruvato, realizando uma ou mais formas de **metabolismo fermentativo** (ver Figura 11.3).

Na fermentação alcoólica (comum em plantas, mas bem mais conhecida em função do fermento de cervejaria), as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase atuam sobre o piruvato, produzindo, ao final, etanol e CO_2 e oxidando NADH no processo. Na fermentação do ácido láctico (comum em músculo de mamíferos, mas também encontrada em plantas), a enzima lactato desidrogenase utiliza NADH para reduzir piruvato a lactato, regenerando, assim, NAD^+.

Sob algumas circunstâncias, os tecidos vegetais podem ser submetidos a concentrações baixas (hipóxicas) ou zero (anóxica) de oxigênio-ambiente, forçando-as a realizar o metabolismo fermentativo. O exemplo mais bem estudado diz respeito a solos alagados ou saturados, nos quais a difusão do oxigênio é suficientemente reduzida, de modo a tornar os tecidos radiculares hipóxicos.

No milho, a resposta inicial à baixa concentração de oxigênio é a fermentação do ácido láctico, mas a resposta subseqüente é a fermentação alcoólica. Acredita-se que o etanol seja um produto final menos tóxico da fermentação, porque ele se difunde para fora da célula, enquanto que o lactato acumula-se e promove a acidificação do citosol. Em vários outros casos, as plantas funcionam sob condições quase anaeróbicas, realizando algum tipo de fermentação.

A fermentação não libera toda a energia disponível em cada molécula de açúcar

Antes de se concluir o tópico da glicólise, é necessário considerar a eficiência da fermentação. *Eficiência* é aqui definida como a energia conservada sob forma de ATP, em relação à energia poten-

(A)

Fase inicial da glicólise Substratos de diferentes origens são canalizados para triose fosfato. Para cada molécula de sacarose que é metabolizada, quatro moléculas de triose fosfato são formadas. O processo requer a adição de até 4 ATP.

CITOSOL

Sacarose

UDP

Invertase

Sacarose sintase

Glicólise

PLASTÍDEO

Amido fosforilase

Amido

Amilase

P_i H_2O

Glicose

Frutose

UDP-Glicose

ATP Hexoquinase ADP

ATP Hexoquinase ADP

PP_i

UDP-Glicose pirofosforilase

UTP

Glicose-1-P

Glicose

Fosfo-glicomu-tase

ATP

ADP

Glicose quinase

Glicose-1-P

Fosfoglicomutase

Hexose fosfato

Glicose-6-P ⇌ Frutose-6-P ⇌ Glicose-6-P

Hexose fosfato isomerase

Hexose fosfato isomerase

AMILOPLASTOS

Glicose-6-P

PP_i

Fosfofrutoquinase PP_i-dependente

P_i

ATP

Fosfofrutoquinase ATP-dependente

ADP

Frutose-1,6-bifosfato

Aldolase

Trioses fosfato

Gliceraldeído-3-fosfato

Triose fosfato isomerase

Diidroxiacetona fosfato

CLOROPLASTOS

Trioses fosfato

NAD^+

P_i

NADH

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

1,3-Bifosfoglicerato

ADP

Fosfoglicerato quinase

ATP

3-Fosfoglicerato

Fosfoglicerato mutase

2-Fosfoglicerato

H_2O

Enolase

HCO_3^-

Fosfoenolpiruvato

PEP carboxilase

Oxaloacetato

ADP

Piruvato quinase

P_i

NADH

NAD^+

Malato desidrogenase

ATP

Piruvato

Malato

CO_2

NADH

NAD^+

Lactato desidrogenase

Lactato

Piruvato descarboxilase

Para a MITOCÔNDRIA

Acetaldeído

NADH

NAD^+

Álcool desidrogenase

Etanol

Reações de fermentação

Fase de conservação de energia da glicólise A triose fosfato é convertida a piruvato. A NAD+ é reduzido a NADH pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. O ATP é sintetizado nas reações catalisadas pela fosfoglicerato quinase e piruvato quinase. Um produto final alternativo, fosfoenolpiruvato, pode ser convertido a malato para oxidação mitocondrial; a NADH pode ser reoxidada durante a fermentação ou pela lactato desidrogenase ou pela álcool desidrogenase.

(B)

Sacarose — Glicose-6-P

Frutose-6-P — Frutose-1,6-P_2

Gliceraldeído-3-P — Diidroxia-cetona-P — 1,3-P_2-Glicerato

3-P-Glicerato — 2-P-Glicerato — Fosfoenol-piruvato

Piruvato — Lactato — Acetaldeído — Etanol

FIGURA 11.3 Reações da glicólise e fermentação vegetais. (A) Na rota principal, a sacarose é oxidada ao ácido orgânico piruvato. As setas duplas indicam reações reversíveis; as setas simples, reações essencialmente irreversíveis. (B) As estruturas dos intermediários. P, fosfato; P_2, bifosfato.

cialmente disponível em uma molécula de sacarose. A mudança-padrão de energia livre ($\Delta G^{0'}$) para a oxidação completa da sacarose é –5.760 kJ mol^{-1} (1.380 kcal mol^{-1}). O valor de $\Delta G^{0'}$ para a síntese de ATP é 32kJ mol^{-1} (7,7 kcal mol^{-1}). No entanto, sob condições não padronizadas, normalmente existentes tanto em células de mamíferos quanto de vegetais, a síntese de ATP requer um acréscimo de energia livre de aproximadamente 50 kJ mol^{-1} (12 kcal mol^{-1}). (Para uma discussão sobre energia livre, ver **Capítulo 2 na Internet.**)

Considerando a síntese líquida de quatro moléculas de ATP para cada molécula de sacarose que é convertida a etanol (ou lactato), a eficiência da fermentação anaeróbica é de aproximadamente de apenas 4%. A maioria da energia disponível na sacarose permanece no subproduto reduzido da fermentação: lactato ou etanol. Durante a respiração aeróbica, o piruvato produzido pela glicólise é transportado para dentro da mitocôndria, onde sofre nova oxidação, resultando em uma conservação muito mais eficiente da energia livre originalmente disponível na sacarose.

Em decorrência da baixa eficiência de conservação de energia na fermentação, uma maior taxa de glicólise é requerida para sustentar a produção de ATP necessária para a sobrevivência celular. Isto é denominado *efeito Pasteur*, em homenagem ao microbiologista francês Louis Pasteur, que foi o primeiro a perceber tal efeito, quando os fermentos mudaram da respiração aeróbica para a fermentação alcoólica anaeróbica. As maiores taxas de glicólise resultam das mudanças nos níveis de metabólitos glicolíticos, assim como do aumento na expressão de genes que codificam enzimas da glicólise e fermentação (Sachs e cols., 1996).

A glicólise vegetal é controlada por seus produtos

In vivo, a glicólise parece ser regulada no nível da fosforilação da frutose-6-fosfato e da reposição do PEP. Ao contrário dos animais, AMP e ATP não são efetores importantes da fosfofrutoquinase e da piruvato quinase. A concentração citosólica de PEP, um inibidor potente da fosfofrutoquinase ATP-dependente dos vegetais, é um regulador mais importante da glicólise vegetal.

O efeito inibitório do PEP sobre a fosfofrutoquinase é fortemente diminuído por fosfato inorgânico, fazendo da razão citosólica entre PEP e P_i um fator crítico no controle da atividade glicolítica vegetal. A piruvato quinase e a PEP carboxilase, enzimas que metabolizam o PEP nas últimas etapas da glicólise (ver Figura 11.3), são, por sua vez, sensíveis à inibição por retroalimentação pelos intermediários do ciclo do ácido cítrico e seus derivados, incluindo malato, citrato, 2-oxoglutarato e glutamato.

Nas plantas, portanto, o controle da glicólise vem "de baixo para cima" (do inglês, *bottom up*)* (ver Figura 11.12), com a regulação primária no nível do metabolismo do PEP pela piruvato quinase e pela PEP carboxilase, e com a regulação secundária exercida pelo PEP na conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato (ver Figura 11.3). Em animais, o controle primário opera na fosfofrutoquinase e o controle secundário na piruvato quinase.

Um benefício do controle "de baixo para cima" da glicólise é permitir às plantas controlar o fluxo glicolítico líquido para piruvato, independentemente de processos metabólicos relacionados, como o ciclo de Calvin e a interconversão sacarose-triose fosfato-amido (Plaxton, 1996). Um outro benefício desse mecanismo de controle é a glicólise poder ajustar-se à demanda por precursores biossintéticos.

A presença de duas enzimas que metabolizam o PEP em células vegetais — piruvato quinase e PEP carboxilase — tem conseqüências não muito claras para o controle da glicólise. Embora as duas enzimas sejam inibidas por metabólitos similares, a PEP carboxilase pode, sob certas condições, realizar uma reação de desvio ao redor da piruvato quinase. O malato resultante pode, então,

*N. de T. A expressão "de baixo para cima" traduz a expressão em inglês *bottom up*, referindo-se ao fato de que o controle dá-se por retroalimentação, na qual produtos mais do final ("de baixo") do processo respiratório regulam a atividade de enzimas que catalisam reações mais iniciais ("de cima") deste processo.

entrar no ciclo do ácido cítrico mitocondrial. Assim, a regulação "de baixo para cima" permite uma grande flexibilidade no controle da glicólise vegetal.

Suporte experimental para múltiplas rotas de metabolismo do PEP vem do estudo de plantas transgênicas de tabaco, com menos de 5% do nível normal de piruvato quinase citosólica em suas folhas (Plaxton, 1996). Nestas plantas, as taxas tanto de respiração quanto de fotossíntese foliar não foram afetadas em relação aos controles, com níveis do tipo selvagem de piruvato quinase. No entanto, o crescimento radicular reduzido nas plantas transgênicas indicou que a reação da piruvato quinase não podia ser evitada sem alguns efeitos prejudiciais.

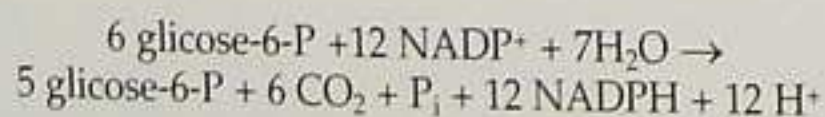
A regulação da conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato também é complexa. A frutose-2,6-bifosfato, uma outra hexose bifosfato, está presente em níveis variáveis no citosol (ver Capítulo 8). Ela inibe de forma marcante a atividade da frutose-1,6-bifosfatase citosólica, mas estimula a atividade da fosfofrutoquinase PP_i-dependente. Tais observações sugerem que a frutose-2,6-bifosfato desempenha um papel central na partição do fluxo entre as rotas ATP-dependente e PP_i-dependente do metabolismo da frutose fosfato, no ponto de cruzamento entre a síntese de sacarose e a glicólise.

O entendimento dos níveis finos da regulação da glicólise requer o estudo das mudanças temporais nos níveis de metabólitos (Givan, 1999). Métodos envolvendo extração rápida e análise simultânea de vários metabólitos — por espectrometria de massa, por exemplo — estão agora disponíveis, em uma abordagem denominada *elaboração de perfil metabólico* (ver **Ensaio 11.2 na Internet**).

A rota das pentoses fosfato produz NADPH e intermediários biossintéticos

A rota glicolítica não é a única disponível para a oxidação de açúcares em células vegetais. Partilhando metabólitos em comum, a **rota oxidativa das pentoses fosfato** (também conhecida como *desvio das hexoses monofosfato*) também pode realizar esta tarefa (Figura 11.4). As reações são realizadas por enzimas solúveis presentes no citosol e em plastídeos. Geralmente, a rota nos plastídeos predomina em relação à rota citosólica (Dennis e cols., 1997).

As primeiras duas reações desta rota envolvem os eventos oxidativos que convertem a glicose-6-fosfato de seis carbonos em um açúcar de cinco carbonos, a ribulose-5-fosfato, com a perda de uma molécula de CO_2 e a geração de duas moléculas de NADPH (e não de NADH). As demais reações da rota convertem ribulose-5-fosfato nos intermediários glicolíticos gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Como a glicose-6-fosfato podes ser regenerada a partir do gliceraldeído-3-fosfato e da frutose-6-fosfato por enzimas glicolíticas, para seis voltas do ciclo, pode-se escrever a reação da seguinte forma:

$$\text{6 glicose-6-P} + 12\ NADP^+ + 7H_2O \rightarrow$$
$$\text{5 glicose-6-P} + 6\ CO_2 + P_i + 12\ NADPH + 12\ H^+$$

O resultado líquido é a completa oxidação de uma molécula de glicose-6-fosfato a CO_2,com a síntese concomitante de 12 moléculas de NADPH.

Estudos de liberação de $^{14}CO_2$ de glicose isotopicamente marcada indicam que a glicólise é a rota de degradação dominante, contabilizando de 80 a 95% do fluxo total de carbono na maioria dos tecidos vegetais. No entanto, a rota das pentoses fosfato contribui para o fluxo, e estudos de desenvolvimento indicam que sua contribuição aumenta à medida que as células vegetais se desenvolvem de um estado meristemático para um estado mais diferenciado (Ap Rees, 1980). A rota oxidativa das pentoses fosfato desempenha diversos papéis no metabolismo vegetal:

- O produto das duas etapas oxidativas é NADPH e acredita-se que este governe as etapas de redução, associadas a várias reações biossintéticas que ocorrem no citosol. Em plastídeos não-verdes, como os amiloplastos, e em cloroplastos que funcionam no escuro, a rota também pode suprir NADPH para reações biossintéticas, como a biossíntese de lipídeos e a assimilação de nitrogênio.
- Como as mitocôndrias vegetais são capazes de oxidar NADPH citosólico através de uma NADPH desidrogenase localizada na superfície externa da membrana interna, parte da força redutora gerada por esta rota pode contribuir para o metabolismo energético celular; isto é, elétrons do NADPH podem terminar reduzindo O_2 e gerando ATP.
- A rota produz ribose-5-fosfato, um precursor da ribose e desoxirribose, requeridas na síntese de RNA e DNA, respectivamente.
- Um outro intermediário nesta rota, a eritrose-4-fosfato de quatro carbonos, combina-se com o PEP na reação inicial que produz compostos fenólicos vegetais, incluindo aminoácidos aromáticos e precursores da lignina, flavonóides e fitoalexinas (ver Capítulo 13).
- Durante os estádios iniciais do enverdecimento, antes de o tecido foliar tornar-se fotoautotrófico, acredita-se que a rota oxidativa das pentoses fosfato esteja envolvida em gerar intermediários do ciclo de Calvin.

Controle da rota oxidativa. A rota oxidativa das pentoses fosfato é controlada pela reação inicial da rota, catalisada pela glicose-6-fosfato desidrogenase, cuja atividade é fortemente inibida por uma alta razão entre NADPH e $NADP^+$.

Na luz, no entanto, provavelmente ocorre pouca atividade da rota oxidativa no cloroplasto, pois os produtos finais da rota, frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, estão sendo sintetizados pelo ciclo de Calvin. Assim, a ação em massa vai governar as interconversões oxidativas da rota na direção da síntese de pentoses. Além disto, a glicose-6-fosfato desidrogenase será inibida durante a fotossíntese por uma alta razão entre NADPH e $NADP^+$ no cloroplasto, assim como por uma inativação redutora envolvendo o sistema ferrodoxina-tiorredoxina (ver Capítulo 8).

O CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO: UM PROCESSO DA MATRIZ MITOCONDRIAL

Durante o século XIX, os biólogos descobriram que, na ausência de ar, as células produzem etanol ou ácido láctico, enquanto que, na presença de ar, as células consomem O_2 e produzem CO_2 e H_2O. Em 1937, o bioquímico inglês, nascido na Alemanha, Hans A. Krebs, relatou a descoberta do **ciclo do ácido cítrico** — também chamado de *ciclo dos ácidos tricarboxílicos* ou *ciclo de Krebs*. A elucidação do ciclo do ácido cítrico não somente explicou como o piruvato é degradado a CO_2 e H_2O; ele também salientou o con-

NADPH é gerado nas duas primeiras reações da rota, nas quais a glicose-6-fosfato é oxidada a ribulose-5-fosfato. Tais reações são essencialmente irreversíveis.

A ribulose-5-fosfato é convertida nos intermediários glicolíticos frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, por meio de uma série de interconversões metabólicas, reações essas livremente reversíveis.

Glicose-6-fosfato

Glicose-6-fosfato desidrogenase

$NADP^+$

NADPH

6-Fosfogluconato

CO_2

Gluconato-6-fosfato desidrogenase

$NADP^+$

NADPH

Ribulose-5-fosfato

Ribulose-5-fosfato

Pentose fosfato isomerase

Pentose fosfato epimerase

Ribose-5-fosfato

Xilulose-5-fosfato

Transcetolase

Gliceraldeído-3-fosfato

Sedo-heptulose-7-fosfato

Transaldolase

Frutose-6-fosfato

Eritrose-4-fosfato

Transcetolase

Gliceraldeído-3-fosfato

Hexose fosfato isomerase

FIGURA 11.4 Reações da rota oxidativa das pentoses fosfato em plantas superiores. P, fosfato.

ceito-chave de ciclos em rotas metabólicas. Por esta descoberta, Hanz Krebs foi agraciado com o Prêmio Nobel em fisiologia e medicina em 1953.

Como o ciclo do ácido cítrico está localizado na matriz das mitocôndrias, começa-se com uma descrição geral da estrutura e funcionamento mitocondrial, conhecimentos obtidos principalmente por meio de experimentos com mitocôndrias isoladas (ver **Tópico 11.1 na Internet**). Então, serão revisadas as etapas do ciclo do ácido cítrico, enfatizando as características específicas às plantas. Para todas as propriedades específicas às plantas, serão consideradas as formas como elas afetam a função respiratória.

As mitocôndrias são organelas semi-autônomas

A degradação da sacarose a piruvato libera menos do que 25% da energia total da sacarose; a energia restante é armazenada nas duas moléculas de piruvato. As duas próximas etapas da respiração (o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa — i. é, o transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP) ocorrem dentro de uma organela limitada por uma membrana dupla, a **mitocôndria.**

Em electromicrografias, as mitocôndrias vegetais — tanto *in situ* quanto *in vitro* — normalmente se parecem esféricas ou em forma de bastão (Figura 11.5), variando de 0,5 a 1,0 µm de diâmetro e tendo até 3 µm de comprimento (Douce, 1985). Com algumas exceções, as células vegetais têm um número substancialmente menor de mitocôndrias do que o encontrado em uma célula animal típica. O número de mitocôndrias por célula vegetal varia e é em geral diretamente relacionado à atividade metabólica do tecido, refletindo o papel mitocondrial no metabolismo energético. As células-guarda, por exemplo, são anormalmente ricas em mitocôndrias.

As características ultra-estruturais das mitocôndrias vegetais são similares às das mitocôndrias de tecidos não-vegetais (ver Figura 11.5). As mitocôndrias vegetais têm duas membranas: uma **membrana externa** lisa, que circunda completamente uma **membrana interna** altamente invaginada. As invaginações da membrana interna são conhecidas como **cristas.** Como conseqüência da área de superfície significativamente aumentada, a membrana interna pode conter mais de 50% da proteína mitocondrial total. A fase aquosa contida dentro da membrana interna é conhecida como **matriz** mitocondrial e a região entre as duas membranas mitocondriais, como **espaço intermembrana.**

As mitocôndrias intactas são osmoticamente ativas, isto é, elas absorvem água e intumescem quando colocadas em um meio hiposmótico. A maioria dos íons inorgânicos e moléculas orgânicas carregadas não é capaz de se difundir livremente para dentro do espaço matricial. A membrana interna é a barreira osmótica. A membrana externa é permeável a solutos que tenham uma massa molecular com menos do que aproximadamente 10.000 Da (ou seja, a maioria dos metabólitos celulares e íons, mas não as proteínas). A fração lipídica de ambas as membranas é principalmente formada por fosfolipídeos, 80% dos quais são ou fosfatidilcolina ou fosfatidiletanolamina.

Como os cloroplastos, as mitocôndrias são organelas semi-autônomas, porque contêm ribossomas, RNA e DNA, que codificam um número limitado de proteínas mitocondriais. As mitocôndrias vegetais são, assim, capazes de realizar as várias etapas da síntese de proteínas e de transmitir suas informações genéticas. As mitocôndrias proliferam-se segundo divisões por fissão de mitocôndrias preexistentes e não por biogênese *de novo* da organela.

O piruvato entra na mitocôndria e é oxidado através do ciclo do ácido cítrico

Conforme já mencionado, o ciclo do ácido cítrico também é conhecido como o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, devido à importância do ácido cítrico (citrato) e do isocítrico (isocitrato), que são ácidos tricarboxílicos que atuam como intermediários iniciais (Figura 11.6). Este ciclo constitui o segundo estádio da respiração e ocorre na matriz mitocondrial. Sua operação exige que o piruvato gerado no citosol durante a glicólise seja transportado pela membrana impermeável interna da mitocôndria, por meio de uma proteína de transporte específica (como será descrito em breve).

Uma vez dentro da matriz mitocondrial, o piruvato é descarboxilado, em uma reação de oxidação, pela enzima piruvato desidrogenase. Os produtos são NADH (do NAD^+), CO_2 e ácido acético na forma de acetil-CoA, no qual uma ligação tioéster liga o ácido acético a um co-fator contendo enxofre, a coenzima A (CoA) (ver Figura 11.6). A piruvato desidrogenase existe como um grande complexo de várias enzimas que catalisam a reação global, em um processo de três etapas: descarboxilação, oxidação e conjugação com CoA.

Na próxima reação, a enzima citrato sintase combina o grupo acetil do acetil-CoA com um ácido dicarboxílico de quatro carbonos (oxaloacetato, OAA) para gerar um ácido tricarboxílico de seis carbonos (citrato). O citrato é, então, isomerizado a isocitrato pela enzima aconitase.

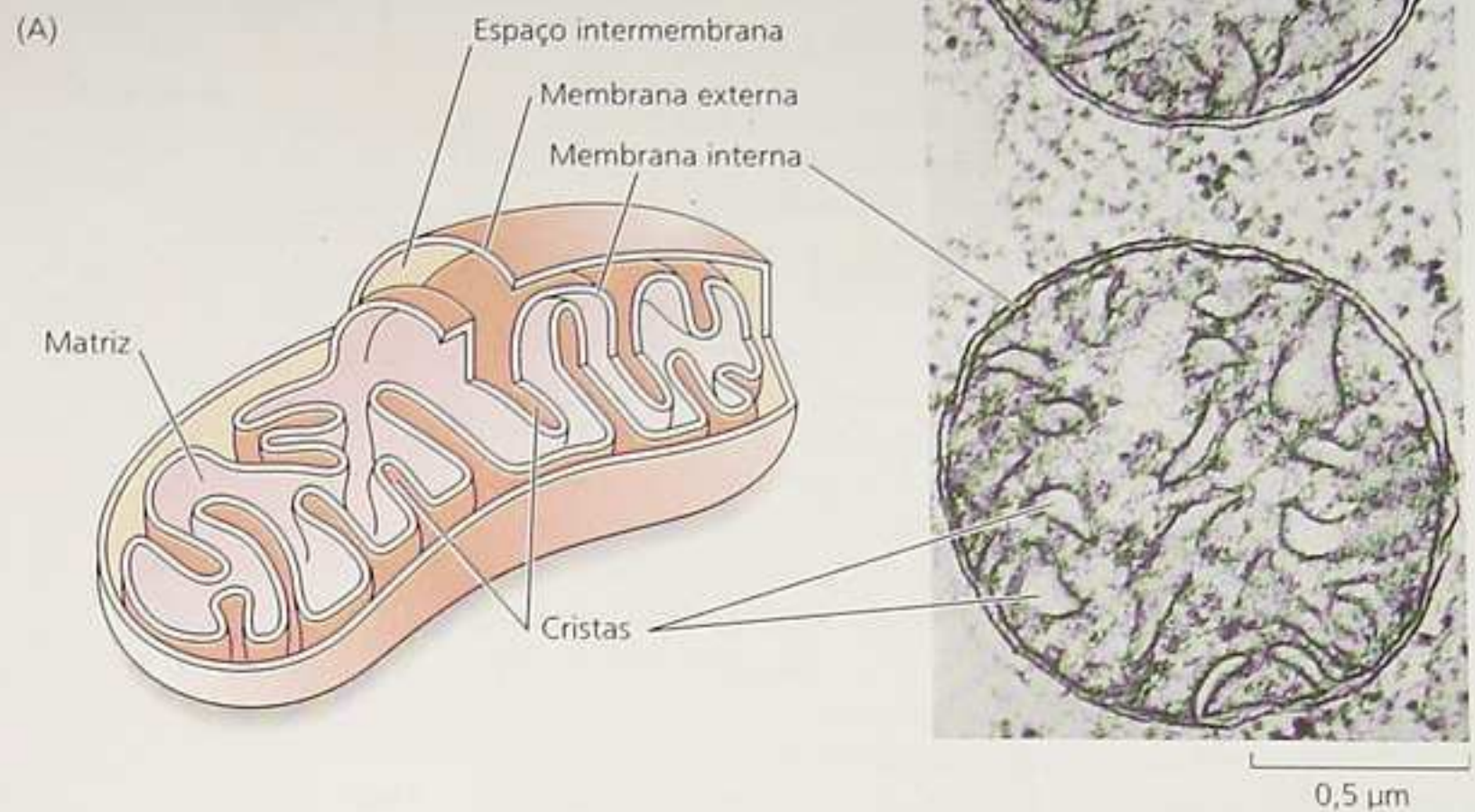
As duas reações seguintes são descarboxilações oxidativas sucessivas, sendo que cada uma delas produz um NADH e libera uma molécula de CO_2, produzindo uma molécula de quatro carbonos, sucinil-CoA. Neste ponto, três moléculas de CO_2 foram produzidas para cada piruvato que ingressou na mitocôndria, ou 12 CO_2 para cada molécula de sacarose oxidada.

Durante o restante do ciclo do ácido cítrico, sucinil-CoA é oxidado a OAA, permitindo a operação continuada do ciclo. Inicialmente, a grande quantidade de energia livre disponível na ligação tioéster do sucinil-CoA é conservada por meio da síntese de ATP a partir de ADP e P_i, por uma fosforilação em nível de substrato catalisada pela sucinil-CoA sintetase (lembrar que a energia livre disponível na ligação tioéster do acetil CoA foi utilizada para formar uma ligação carbono-carbono na etapa catalisada pela citrato sintase). O sucinato resultante é oxidado a fumarato pela sucinato desidrogenase, que é a única enzima do ciclo do ácido cítrico associada a membranas e também parte da cadeia de transporte de elétrons (que é o próximo tópico importante a ser discutido neste capítulo).

Os elétrons e prótons removidos do sucinato terminam não no NAD^+, mas em outro co-fator envolvido em reações redox: a FAD (flavina adenina dinucleotídeo), ligada covalentemente ao sítio ativo da sucinato desidrogenase, e que sofre uma redução reversível com dois elétrons para produzir $FADH_2$ (ver Figura 11.2).

Nas duas reações finais do ciclo do ácido cítrico, o fumarato é hidratado para produzir malato, que é subseqüentemente oxidado pela malato desidrogenase, para regenerar OAA e produzir outra molécula de NADH. O OAA produzido é agora capaz de reagir com outro acetil-CoA e continuar o ciclo.

A oxidação em etapas de uma molécula de piruvato na mitocôndria dá origem a três moléculas de CO_2, sendo que a maior parte da energia livre liberada durante estas oxidações é conservada na forma de quatro NADH e um FADH2. Além disso, uma molécula de ATP é produzida por uma fosforilação em nível de substrato durante o ciclo do ácido cítrico.

FIGURA 11.5 Estrutura das mitocôndrias vegetais. (A) Representação tridimensional de uma mitocôndria, mostrando as invaginações da membrana interna, denominadas cristas, assim como a localização da matriz e os espaços intermembranas (ver também Figura 11.10). (B) Electromicrografia de mitocôndrias em uma célula de mesofilo de *Vicia faba* (foto de Gunnig e Steer, 1996).

Todas as enzimas associadas ao ciclo do ácido cítrico são encontradas nas mitocôndrias vegetais. Algumas delas podem estar associadas em complexos multienzimáticos, os quais facilitariam o movimento de metabólitos entre as enzimas.

O ciclo do ácido cítrico em plantas tem características singulares

As reações do ciclo do ácido cítrico destacadas na Figura 11.6 não são todas idênticas àquelas realizadas pelas mitocôndrias animais. A etapa catalisada pela sucinil-CoA sintetase, por exemplo, produz ATP em plantas e GTP em animais.

Uma característica do ciclo do ácido cítrico em plantas, ausente em muitos outros organismos, é a atividade significativa da enzima málica NAD^+, que foi encontrada na matriz de todas as mitocôndrias vegetais até hoje analisadas. Esta enzima catalisa a descarboxilação oxidativa do malato:

$$\text{Malato} + NAD^+ \rightarrow \text{piruvato} + CO_2 + NADH$$

A presença da enzima málica NAD^+ permite às mitocôndrias vegetais operarem rotas alternativas para o metabolismo do PEP derivado da glicólise. Conforme já descrito, o malato pode ser sintetizado a partir do PEP no citosol, por meio das enzimas PEP carboxilase e malato desidrogenase (ver Figura 11.3). O malato é, então, transportado para a matriz mitocondrial, onde a enzima málica NAD^+ pode oxidá-lo a piruvato. Tal reação possibilita a completa oxidação líquida dos intermediários do ciclo do ácido cítrico, como malato (Figura 11.7A) ou citrato (Figura 11.7B) (Oliver e McIntosh, 1995).

Alternativamente, o malato produzido por intermédio da PEP carboxilase pode repor os intermediários do ciclo do ácido cítrico utilizados em biossíntese. As reações que podem repor intermediários em um ciclo metabólico são conhecidas como *anapleróticas*. Por exemplo, a exportação de 2-oxoglutarato para a assimilação do nitrogênio no cloroplasto vai provocar uma falta de malato, necessário para a reação da citrato sintase. Este malato pode ser reposto pela rota da PEP carboxilase (Figura 11.7C).

A presença de uma rota alternativa para a oxidação do malato é consistente com a observação segundo a qual muitas plantas, além daquelas que realizam o metabolismo ácido das crassuláceas (ver Capítulo 8), armazenam quantidades significativas de malato em seus vacúolos centrais.

TRANSPORTE DE ELÉTRONS E SÍNTESE DE ATP NA MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

O ATP é o carregador de energia utilizado pelas células para governar processos metabólicos, e a energia química conservada durante o ciclo do ácido cítrico sob formas de NADH e $FADH_2$ (equivalentes redox com elétrons de alta energia) precisa ser convertida a ATP para realizar trabalho útil dentro da célula. Este processo dependente de O_2, denominado **fosforilação oxidativa**, ocorre na membrana mitocondrial interna.

Nesta seção, será apresentado o processo pelo qual o nível de energia dos elétrons é reduzido de maneira gradual e conservado na forma de um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. Embora fundamentalmente simi-

A enzima málica descarboxila o malato a piruvato e permite às mitocôndrias vegetais oxidarem o malato.

Uma molécula de ATP é sintetizada por uma fosforilação no nível de substrato, durante a reação catalisada pela sucinil-CoA sintetase.

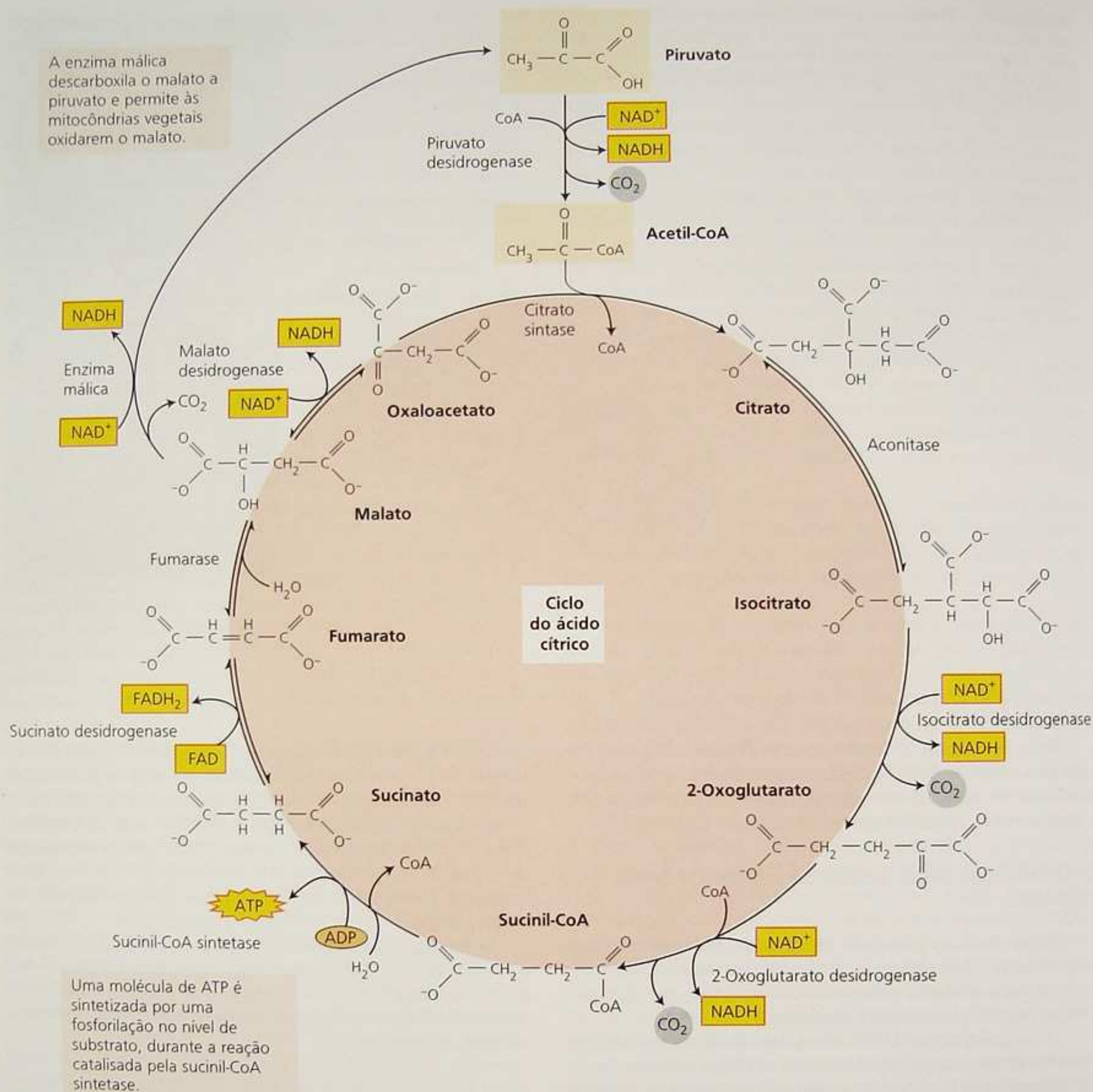



FIGURA 11.6 Reações e enzimas do ciclo do ácido cítrico vegetal. O piruvato é completamente oxidado a três moléculas de CO_2. Os elétrons liberados durante estas oxidações são utilizados para reduzir quatro moléculas de NAD^+ a NADH e uma molécula de FAD a $FADH_2$.

lar em todas as células aeróbicas, a cadeia de transporte de elétrons em plantas (e fungos) contém múltiplas NAD(P)Hs desidrogenases e uma oxidase alternativa, não encontrada em mitocôndrias de mamíferos.

Será examinada também a enzima que utiliza a energia do gradiente de prótons para sintetizar ATP: a F_OF_1-ATP sintase. Depois de pesquisar os diversos estádios na produção de ATP, será feito um resumo das etapas de conservação de energia em cada estádio, bem como os mecanismos reguladores que coordenam diferentes rotas.

A cadeia de transporte de elétrons catalisa o fluxo de elétrons do NADH ao O_2

Para cada molécula de sacarose oxidada pela glicólise e rotas do ciclo do ácido cítrico, quatro moléculas de NADH são geradas

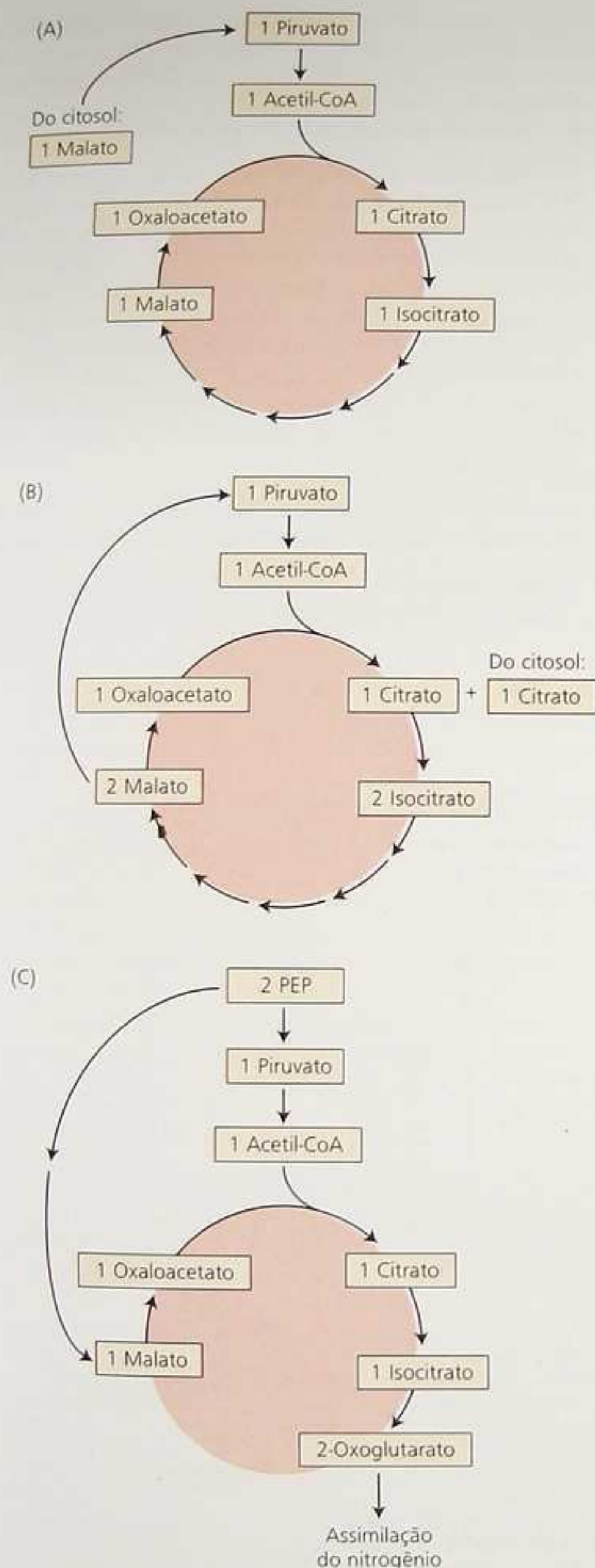
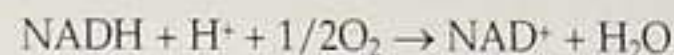



FIGURA 11.7 A enzima málica e a PEP carboxilase conferem às plantas flexibilidade metabólica para o metabolismo do fosfoenolpiruvato. A enzima málica possibilita às mitocôndrias dos vegetais oxidar a CO_2 tanto malato (A) quanto citrato (B), sem o envolvimento do piruvato originário da glicólise. A ação conjunta da PEP carboxilase e da piruvato quinase convertem o PEP glicolítico a 2-oxoglutarato, que é utilizado na assimilação do nitrogênio (C).

no citosol e 16 moléculas de NADH mais quatro moléculas de $FADH_2$ (associada à sucinato desidrogenase) são geradas na matriz mitocondrial. Tais compostos reduzidos precisam ser reoxidados ou todo o processo respiratório pára.

A cadeia de transporte de elétrons catalisa um fluxo de elétrons do NADH (ou $FADH_2$) ao oxigênio, o aceptor final de elétrons do processo respiratório. Para a oxidação do NADH, a transferência global de dois elétrons pode ser assim escrita:

$$NADH + H^+ + 1/2O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O$$

A partir dos potenciais de redução dos pares NADH-NAD^+ (–320mV) e H_2O-1/$2O_2$ (+810mV), é possível calcular que a energia livre padrão desprendida durante esta reação global ($-nF\Delta E^0$) é cerca de 220 kJ mol^{-1} (53 kcal mol^{-1}) para cada dois elétrons (para um discussão detalhada sobre energia livre padrão, ver **Capítulo 2 na Internet**). Como o potencial de redução do sucinato-fumarato é maior (+30 mV), apenas 152 kJ mol^{-1} (36 kcal mol^{-1}) de energia são liberados para cada dois elétrons gerados durante a oxidação do sucinato. O papel da cadeia de transporte de elétrons é realizar a oxidação do NADH (e $FADH_2$) e, no processo, utilizar parte da energia livre desprendida para gerar um gradiente eletroquímico de prótons, $\Delta\mu H^+$, através da membrana mitocondrial interna.

A cadeia de transporte de elétrons das plantas contém o mesmo conjunto de carregadores de elétrons encontrado nas mitocôndrias de outros organismos (Figura 11.8) (Siedow, 1995; Siedow e Umbach, 1995). As proteínas individuais de transporte de elétrons estão organizadas em quatro complexos multiprotéicos (identificados pelos numerais romanos de I a IV), todos localizados na membrana mitocondrial interna.

Complexo I (NADH desidrogenase). Os elétrons do NADH gerados na matriz mitocondrial durante o ciclo do ácido cítrico são oxidados pelo complexo I (uma NADH desidrogenase). Os carregadores de elétrons no complexo I incluem um co-fator fortemente ligado (flavina mononucleotídeo [FMN], quimicamente similar à FAD; ver Figura 11.2B), além de vários centros ferro-enxofre. O complexo I, então, transfere estes elétrons à ubiquinona. Quatro prótons são bombeados da matriz para o espaço intermembrana para cada par de elétrons que passa pelo complexo.

A **ubiquinona**, um pequeno carregador de prótons e elétrons solúvel em lipídeos, está localizada dentro da membrana interna. Ela não está fortemente associada a nenhuma proteína e pode se difundir no interior hidrofóbico da bicamada da membrana.

Complexo II (sucinato desidrogenase). A oxidação do sucinato no ciclo do ácido cítrico é catalisada por este complexo, sendo os equivalentes redutores transferidos via $FADH_2$ e um grupo de proteínas ferro-enxofre para o *pool* de ubiquinona. Este complexo não bombeia prótons.

Complexo III (complexo de citocromos bc_1). Este complexo oxida a ubiquinona reduzida (ubiquinol) e transfere os elétrons ao citocromo *c* por intermédio de um centro ferro-enxofre, dois citocromos tipo-*b* (*b*565 e *b*560) e de um citocromo c_1 ligado à membrana. Quatro prótons por par de elétrons são bombeados pelo complexo III.

O **citocromo** ***c*** é uma pequena proteína fracamente presa à superfície externa da membrana interna e serve como um carregador móvel que transfere elétrons ente os complexos III e IV.

Complexo IV (citocromo c oxidase). Este complexo contém dois centros de cobre (Cu_A e Cu_B) e os citocromos *a* e *a3*. O complexo IV é a oxidase terminal e realiza a redução com quatro elétrons do O_2 a duas moléculas de H_2O. Dois prótons são bombeados para cada par de elétrons (ver Figura 11.8).

Tanto estrutural quanto funcionalmente, a ubiquinona e o complexo de citocromos bc_1 são muito similares à plastoquinona e ao complexo de citocromos b_6f, respectivamente, na cadeia fotossintética de transporte de elétrons (ver Capítulo 7).

Algumas enzimas transportadoras de elétrons são peculiares às mitocôndrias vegetais

Além do conjunto de carregadores de elétrons descritos na seção anterior, as mitocôndrias vegetais contêm alguns componentes não encontrados nas mitocôndrias de mamíferos (ver Figura 11.8). Deve ser observado que nenhuma dessas enzimas adicionais bombeia prótons e que a conservação de energia é, portanto, menor sempre que utilizadas:

- Duas NAD(P)H desidrogenases, ambas Ca^{2+}-dependentes, ligadas à superfície externa da membrana interna e voltadas para o espaço intermembrana, podem oxidar NADH e NADPH citosólicos. Os elétrons destas NAD(P)H desidrogenases externas — ND_{ex}(NADH) e ND_{ex}(NADPH) — ingressam na cadeia de transporte de elétrons principal no nível do *pool* de ubiquinona (ver **Tópico 11.2 na Internet**) (Møller, 2001).
- As mitocôndrias vegetais têm duas rotas de oxidação do NADH matricial. O fluxo de elétrons pelo complexo I, descrito na seção anterior, é sensível à inibição por diversos compostos, incluindo rotenona e piericidina. Além disso, as mitocôndrias vegetais possuem uma desidrogenase resistente à rotenona, ND_{in}(NADH), para a oxidação do NADH derivado dos substratos do ciclo do ácido cítrico. A função desta rota pode muito bem ser a de um desvio, engajado quando o complexo I está sobrecarregado, como sob condições fotorrespiratórias, conforme ser verá em breve (ver também **Tópico 11.2 na Internet**).
- Uma NADPH desidrogenase, ND_{in}(NADPH), está presente na superfície matricial. Pouco se sabe a respeito desta enzima.
- A maioria das plantas, se não todas, tem uma rota respiratória "alternativa" para redução de oxigênio. Essa rota envolve a

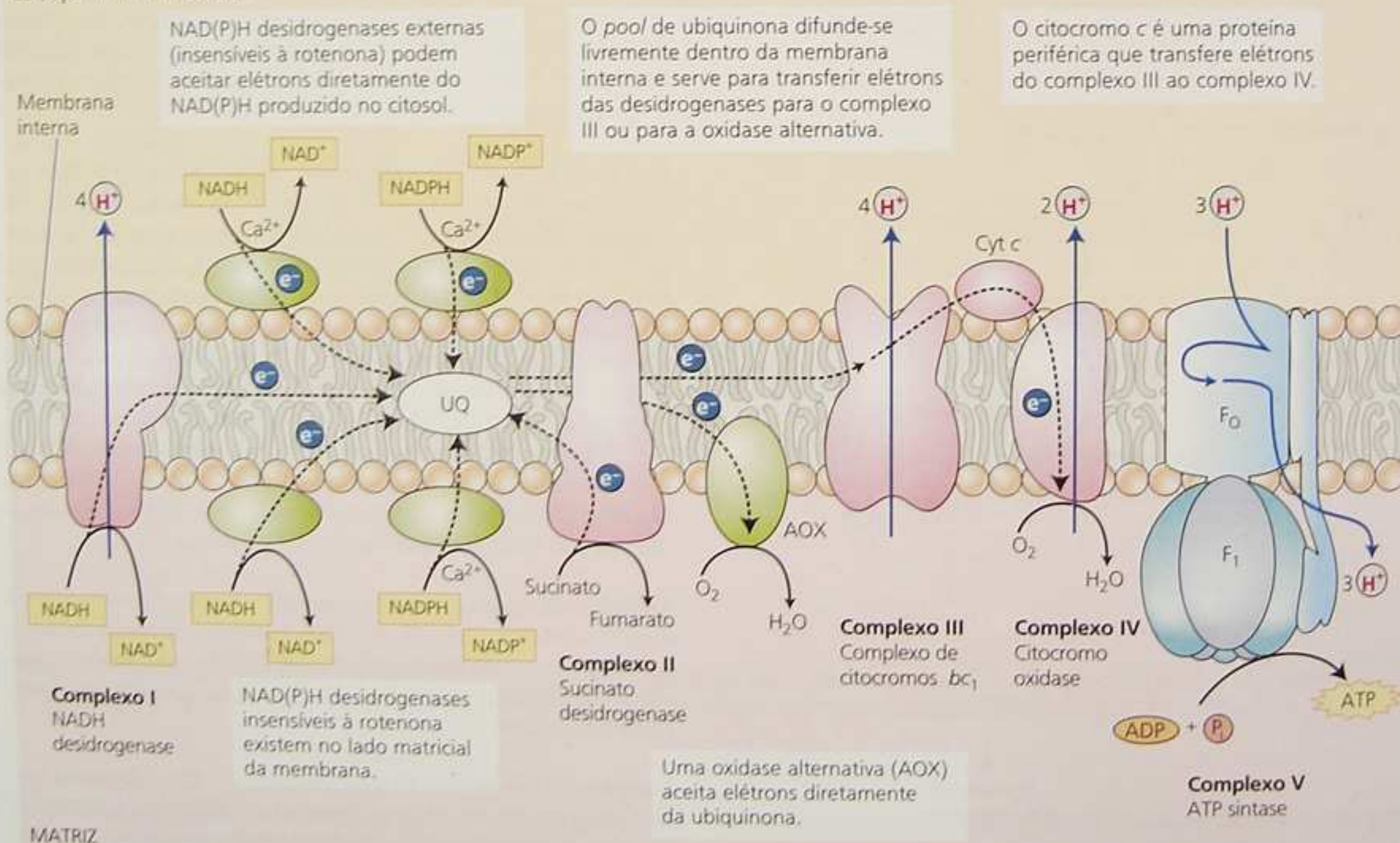



FIGURA 11.8 Organização da cadeia de transporte de elétrons e síntese de ATP na membrana interna das mitocôndrias vegetais. Além dos cinco complexos protéicos padrões encontrados em quase todas as outras mitocôndrias, a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias vegetais contém cinco enzimas adicionais, marcadas de verde. Nenhuma destas enzimas adicionais bombeia prótons. Inibidores específicos, rotenona para o complexo I, antimicina para o complexo III, cianeto para o complexo IV e ácido salicil-hidroxâmico (SHAM) para a oxidase alternativa, são importantes ferramentas na investigação da cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias vegetais.

chamada oxidase alternativa, que, ao contrário da citocromo *c* oxidase, é insensível à inibição por cianeto, azida ou monóxido de carbono (ver **Tópico 11.3 na Internet**).

A natureza e o significado fisiológico dessas enzimas específicas dos vegetais serão abordados de maneira mais completa mais adiante neste capítulo.

A síntese de ATP na mitocôndria está acoplada ao transporte de elétrons

Na fosforilação oxidativa, a transferência de elétrons para o oxigênio por intermédio dos complexos I a IV é acoplada à síntese de ATP, a partir de ADP e P_i via ATP sintase (complexo V). O número de ATPs sintetizado depende da natureza do doador de elétrons.

Em experimentos conduzidos com o uso de mitocôndrias isoladas, os elétrons derivados do NADH interno (matriz) geram razões ADP:O (o número de ATPs sintetizados por cada dois elétrons transferidos ao oxigênio) de 2,4 a 2,7 (Tabela 11.1). Sucinato e NADH externamente adicionados dão cada um valores na faixa de 1,6 a 1,8, enquanto que o ascorbato, que serve como doador artificial de elétrons ao citocromo *c*, gera valores de 0,8 a 0,9. Resultados como estes (tanto para mitocôndrias vegetais quanto animais) levaram ao conceito geral de que existem três locais de conservação de energia ao longo da cadeia de transporte de elétrons, nos complexos I, III e IV.

As razões ADP:O experimentais concordam bastante bem com os valores calculados com base no número de H^+ bombeados pelos complexos I, III e IV e o custo de H^+ para sintetizar um ATP (ver próxima seção e Tabela 11.1). Por exemplo, os elétrons de NADH externo passam apenas pelos complexos III e IV, de modo que, no total, são bombeados 6 H^+, dando 1,5 ATP (quando não é usada a rota alternativa de oxidase).

O mecanismo da síntese mitocondrial de ATP baseia-se na hipótese quimiosmótica, descrita no **Tópico 6.3 na Internet** e no Capítulo 7, que foi inicialmente proposta em 1961 por Peter Mitchell, ganhador do prêmio Nobel, como um mecanismo geral de conservação de energia através de membranas biológicas (Nicholls e Ferguson, 2002). De acordo com a teoria quimiosmótica, a orientação dos carregadores de elétrons dentro da membrana mitocondrial interna permite o transporte de prótons (H^+) através da membrana interna durante o fluxo de elétrons. Inúmeros estudos confirmaram que o transporte mitocondrial de elétrons está associado à transferência líquida de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (ver Figura 11.8) (Whitehouse e Moore, 1995).

Como a membrana mitocondrial interna é impermeável a H^+, um gradiente eletroquímico de prótons pode se acumular. Conforme discutido nos Capítulos 6 e 7, a energia livre associada à formação de um gradiente eletroquímico de prótons (Δm_{H^+}, também chamado de força motriz de prótons, Δp, quando expressa em unidades de volts) é composta de um componente potencial elétrico transmembrana (ΔE) e um componente potencial químico (ΔpH), de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta p = \Delta E - 59\Delta pH$$

onde,

$$\Delta E = E_{dentro} - E_{fora}$$

e

$$\Delta pH = pH_{dentro} - pH_{fora}$$

O ΔE resulta da distribuição assimétrica de uma espécie com carga (H^+) através da membrana, sendo o ΔpH devido à diferença na concentração de prótons através da membrana. Como os prótons são translocados da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, o ΔE resultante através da membrana mitocondrial interna é negativo.

Como mostra esta equação, tanto ΔE quanto ΔpH contribuem para a força motriz de prótons em mitocôndrias vegetais, embora o ΔE normalmente apresente-se com maior magnitude, provavelmente devido à grande capacidade de tamponamento, tanto do citosol como da matriz, o que impede grandes mudanças de pH. Esta situação contrasta com aquela no cloroplasto, na qual quase toda a força motriz de prótons na membrana tilacóide é formada por um gradiente de prótons (ver Capítulo 7).

A adição de energia livre exigida para gerar $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ vem da energia livre desprendida durante o transporte de elétrons. Não está bem entendido em todos os casos como o transporte de elétrons está acoplado à translocação de prótons. Devido à baixa permeabilidade (condutância) da membrana interna a prótons, o gradiente eletroquímico de prótons é razoavelmente estável, uma vez gerado, podendo a energia livre $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ser utilizada para realizar trabalho químico (síntese de ATP). O $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ é acoplado à síntese de ATP por um complexo de proteínas adicional, associado à membrana interna, a F_oF_1-ATP sintase.

A **F_oF_1-ATP sintase** (também chamada de *complexo V*) consiste de dois componentes principais, F_o e F_1 (ver Figura 11.8). F_1 é um complexo protéico periférico de membrana, composto de pelo menos cinco subunidades diferentes e contém o sítio catalítico para conversão de ADP e P_i em ATP. Este complexo é ligado ao lado matricial da membrana interna. F_o é um complexo protéico integral de membrana, constituído de pelo menos três polipeptídeos diferentes que formam um canal pelo qual os prótons cruzam a membrana interna.

TABELA 11.1
Razões ADP: O teóricas e experimentais em mitocôndrias vegetais isoladas

Substrato	Razão ADP:O	
	Teórica[a]	Experimental
Malato	2,5	2,4-2,7
Sucinato	1,5	1,6-1,8
NADH (externo)	1,5	1,6-1,8
Ascorbato	1,0[b]	0.8-0,9

[a]Admite-se que os complexos I, III e IV bombeiam 4,4 e 2H+ por 2 elétrons, respectivamente; que o custo de sintetizar um ATP e exportá-lo ao citosol é de 4H+ (Brand, 1994) e que as rotas não fosforilantes não estão ativas.
[b]A citocromo *c* oxidase bombeia apenas dois prótons quando ela é medida com o ascorbato como doador de elétrons. No entanto, dois elétrons movem-se da superfície externa da membrana interna (onde os elétrons são doados), ao longo da membrana interna, para o lado de dentro, matricial. Como resultado, 2H+ são consumidos no lado matricial, o que isto significa que o movimento líquido de H+ e de cargas é equivalente ao movimento de um total de 4H+, resultando em uma razão ADP:O de 1,0.

A passagem de prótons através do canal é acoplada ao ciclo catalítico do componente F_1 da ATP sintase, permitindo a síntese continuada de ATP e a utilização simultânea do $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Para cada ATP sintetizado, $3H^+$ passam pelo F_o, vindos do espaço intermembrana para a matriz, ao longo de um gradiente eletroquímico de prótons.

A estrutura, observada em raio X de alta resolução, da maioria dos complexos F_1 da ATP sintase mitocondrial de mamíferos sustenta o "modelo rotacional" para o mecanismo catalítico da síntese de ATP (ver **Tópico 11.4 na Internet**) (Abrahams e cols., 1994). A estrutura e a função da ATP sintase mitocondrial são similares àquela da CF_o-CF_1 ATP sintase na fotofosforilação (ver Capítulo 7).

O funcionamento do mecanismo quimiosmótico da síntese de ATP tem várias implicações. Primeiro, o verdadeiro sítio de formação do ATP na membrana mitocondrial interna é a ATP sintase e não os complexos I, III ou IV. Tais complexos servem como locais de conservação de energia, pelos quais o transporte de elétrons é acoplado à geração de um $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$.

Segundo, a teoria quimiosmótica explica o mecanismo de ação dos desacopladores, uma ampla gama de compostos químicos não-relacionados (incluindo 2,4-dinitrofenol e FCCP [*p*-trifluorometoxicarbonilcianeto fenilidrazona]), que diminuem a síntese mitocondrial de ATP, mas que normalmente estimulam a taxa de transporte de elétrons (ver **Tópico 11.5 na Internet**). Todos esses compostos tornam a membrana interna permeável a prótons, o que impede o acúmulo de um $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ suficientemente grande para gerar síntese de ATP.

Em experimentos com mitocôndrias isoladas, taxas maiores de fluxo de elétrons (medidas como a taxa de consumo de oxigênio na presença de um substrato como o sucinato) são observadas mais na adição de ADP (denominado de *estado 3*) do que na sua ausência (Figura 11.9). O ADP fornece um substrato que estimula a dissipação do $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ via F_o-F_1 ATP sintase durante a síntese de ATP. Quando todo o ADP é convertido a ATP, o $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ novamente acumula-se e reduz a taxa de fluxo de elétrons (*estado 4*). A razão das taxas com e sem ADP (estado 3:estado 4) é denominada *razão de controle respiratório*.

1. A adição de sucinato inicia a transferência de elétrons mitocondrial, a qual é medida com um eletrodo de oxigênio como a taxa de redução de oxigênio (a H_2O).

2. A adição de cianeto inibe o fluxo de elétrons por meio da principal rota dos citocromos e somente permite o fluxo de elétrons até o oxigênio via rota alternativa resistente ao cianeto, que é subseqüentemente inibida pela adição de SHAM.

Percentagem do oxigênio inicial (0–150); Tempo (minutos) (0–7); Mitocôndrias; Sucinato; ADP; 68; 175; Estado 3; Estado 4; 112; ADP; 257; KCN; 71; SHAM; 0

3. A adição de ADP estimula a transferência de elétrons (estado 3), facilitando a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons.

4. Quando todo o ADP foi convertido a ATP, a transferência de elétrons reverte para uma taxa menor (estado 4).

FIGURA 11.9 Regulação da taxa respiratória por ADP durante a oxidação do sucinato em mitocôndrias isoladas de *Vigna radiata*. Os números abaixo dos traços são as taxas de consumo de oxigênio expressas como O_2 consumido (nmol min^{-1} mg proteína $^{-1}$) (cedido por Steven J. Stegink).

Os transportadores trocam substratos e produtos

O gradiente eletroquímico de prótons também desempenha um papel no movimento de ácidos orgânicos do ciclo do ácido cítrico e de substratos e produtos da síntese de ATP para dentro e para fora das mitocôndrias. Embora o ATP seja sintetizado na matriz mitocondrial, a maioria é utilizada fora da mitocôndria, de forma que um mecanismo eficiente faz-se necessário para mover ADP para dentro e ATP para fora da organela.

O transporte de adenilato envolve uma outra proteína da membrana interna, o transportador ADP/ATP (adenina nucleotídeo), que catalisa a troca de ADP e ATP pela membrana interna (Figura 11.10). O movimento do ATP^{4-}, mais negativamente carregado, para fora da mitocôndria, em troca de ADP^{3-} — ou seja, uma carga negativa líquida para fora — é governado pelo gradiente de potencial elétrico (ΔE, positivo fora) gerado pelo bombeamento de prótons.

A absorção de fosfato inorgânico (P_i) envolve um proteína de transporte ativo de fosfato, que utiliza o componente de gradiente de prótons (ΔpH) da força motriz de prótons, para governar a troca eletroneutra de P_i^- (para dentro) por OH^- (para fora). Desde que o ΔpH seja mantido através da membrana interna, o conteúdo de P_i dentro da matriz permanecerá alto. Raciocínio similar aplica-se à absorção de piruvato, a qual é governada pela troca eletroneutra de piruvato por OH^-, levando à absorção continuada de piruvato do citosol (ver Figura 1.10).

O custo total de absorção de um fosfato (1 OH^- para fora, que é o mesmo que 1 H^+ para dentro) e de troca de ADP por ATP (uma carga negativa para fora, que é o mesmo que uma carga positiva para dentro) é 1 H^+. Este H^+ também deveria ser incluído no cálculo do custo de síntese de um ATP. Assim, o custo total é de 3 H^+

FIGURA 11.10 Transporte transmembrana em mitocôndrias vegetais. Um gradiente eletroquímico de prótons ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) que consiste de um potencial de membrana (ΔE, –200mV, negativo dentro) e um ΔpH (alcalino dentro) é estabelecido através da membrana mitocondrial interna durante o transporte de elétrons, conforme descrito no texto. Metabólitos específicos são transportados por proteínas especializadas de membrana, denominadas transportadores ou carregadores (Douce, 1985). ▶

A absorção de piruvato em troca de um íon hidroxila é mediada pelo transportador de piruvato.

CITOSOL
pH 7.5

Piruvato$^-$
Transportador de piruvato
OH^-

Membrana interna
Espaço intermembrana
Membrana externa

MATRIZ
pH 8.0

F_1
F_o

O ΔpH governa a absorção eletroneutra de Pi pelo transportador de fosfato.

P_i^-
OH^-
Transportador de fosfato

Poro

I
II
III
IV

Complexos de transporte de elétrons

Transportador de adenina nucleotídeo

P_i^-

Baixa $[H^+]$

ADP^{3-}
ADP^{3-}
ATP^{4-}
ATP^{4-}

O componente potencial de membrana (ΔE) do gradiente de prótons governa a troca eletrogênica de ADP do citosol por ATP da mitocôndria por intermédio do transportador de adenina nucleotídeo.

Alta $[H^+]$

F_o
F_1

ATP sintase (complexo V)

Transportador de tricarboxilatos

Citrato^{2-}
Malato^{2-}

O ácido tricarboxílico citrato é trocado por um ácido dicarboxílico, como malato ou sucinato.

A energia livre liberada pela dissipação do gradiente de prótons está acoplada à síntese de ATP^{4-} a partir do ADP^{3-} e P_i, por meio dos vários complexos de F_oF_1-ATP sintase que atravessam a membrana interna.

Desacopladores

F_1
F_o

P_i^{2-}
Malato^{2-}

Transportador de dicarboxilatos

Desacopladores (e a proteína desacopladora) permitem o rápido movimento de prótons pela membrana interna, impedindo o acúmulo do gradiente eletroquímico de prótons e reduzindo a taxa de síntese de ATP, mas não a taxa de transferência de elétrons.

A absorção de ácidos dicarboxílicos, como malato ou sucinato, em troca de um íon fosfato é mediada pelo transportador de dicarboxilatos.

usados pela ATP sintase mais 1 H+ para a troca através da membrana, ou um total de 4 H^+.

A membrana interna também contém transportadores para ácidos dicarboxílicos (malato ou sucinato) trocados por P_i^{2-} e pelo ácido tricarboxílico citrato, substituído por malato (ver Figura 11.10 e Tópico 11.5 na Internet).

A respiração aeróbica gera cerca de 60 moléculas de ATP por molécula de sacarose

A oxidação completa de uma molécula de sacarose leva à formação líquida de

- Oito moléculas de ATP por fosforilação em nível de substrato (quatro durante a glicólise e quatro no ciclo do ácido cítrico)
- Quatro moléculas de NADH no citosol
- Dezesseis moléculas de NADH mais quatro moléculas de FDH_2 (via sucinato desidrogenase) na matriz mitocondrial

Com base nos valores teóricos de ADP:O (ver Tabela 11.1), um total de aproximadamente 52 moléculas de ATP será gerado por sacarose pela fosforilação oxidativa. O resultado é um total de 60 ATPs sintetizados por sacarose (Tabela 1.2).

Usando 50 kJ mol^{-1} (12 kcal mol^{-1}) como a energia livre real de formação de ATP *in vivo*, verificou-se que aproximadamente 3.010 kJ mol^{-1} (720 kcal mol^{-1}) de energia livre são conservados na forma de ATP por mole de sacarose oxidada durante a respiração aeróbica. Tal quantidade representa cerca de 52% da energia livre padrão disponível para a completa oxidação da sacarose; o resto é perdido como calor. Isto é uma vasta melhoria, comparada à conservação de apenas 4% de energia disponível na sacarose em ATP, que está associada ao metabolismo fermentativo.

Diversas subunidades dos complexos respiratórios são codificadas pelo genoma mitocondrial

Com o primeiro seqüenciamento completo de DNA mitocondrial (mtDNA) vegetal em *Arabidopsis thaliana* (Marienfeld e cols., 1999), o conhecimento acerca do genoma mitocondrial evoluiu significativamente.

TABELA 11.2
Produção máxima de ATP citosólico da completa oxidação de sacarose a CO_2 por meio da glicólise aeróbica e do ciclo do ácido cítrico

Reação parcial		ATP por sacarose[a]
Glicólise		
4 fosforilações em nível de substrato		4
4 NADH	4 × 1,5	6
Ciclo do ácido cítrico		
4 fosforilações em nível de substrato		4
4 $FADH_2$	4 × 1,5	6
16 NADH	16 × 2,5	40
Total		60

Fonte: Adaptada de Brand 1994.
Nota: Admite-se que o NADH citosólico esteja oxidado pela NADH desidrogenase externa. Presume-se que as rotas não-fosforilantes não estão atuando.
[a]Calculado segundo os valores teóricos da Tabela 11.1.

Em geral, algumas características do sistema genético mitocondrial não são encontradas nas mitocôndrias de animais, protozoários ou mesmo fungos. De modo curioso, o processamento do RNA difere entre mitocôndrias vegetais e mitocôndrias da maioria dos demais organismos. Muitos genes mitocondriais vegetais contêm íntrons, enquanto outros são até divididos entre duas moléculas de RNA transcritas separadamente, que precisam ser unidas por *splicing*. O mtDNA das plantas também carece de complementaridade exata ao mRNA traduzido (ver Tópico 11.6 na Internet). Uma outra característica típica do sistema genético mitocondrial das plantas é que ele observa estritamente o código genético universal, não mostrando nenhum dos desvios encontrados em mtDNA em todos os outros reinos.

Os genomas mitocondriais das plantas são normalmente muito maiores que os dos animais. O mtDNA está na faixa de 200 a 2.400 pares de quilobases (kb) em tamanho, com grandes variações mesmo entre espécies vegetais intimamente relacionadas. Esse tamanho compara-se com o genoma compacto e uniforme de 16 kb encontrado em mitocôndrias de mamíferos. As diferenças em tamanho são devidas sobretudo à presença de muitas seqüências não-codificadoras, incluindo numerosos íntrons, em mtDNA vegetal. O mtDNA de mamíferos codifica apenas 13 proteínas, em contraste com as 35 proteínas conhecidas, codificadas pelo mtDNA de *Arabidopsis*. Tanto mitocôndrias de vegetais quanto de mamíferos codificam rRNAs e tRNAs.

Os genes do mtDNA podem ser divididos em dois grupos principais: aqueles necessários para a expressão dos genes mitocondriais (tRNA, rRNA e proteínas ribossomais) e aqueles requeridos pelos complexos de fosforilação oxidativa. O mtDNA vegetal codifica quatro subunidades para o complexo I, um para o complexo III, três para o complexo IV, três para ATP sintase e cinco proteínas para a biogênese de citocromos (Mariente e cols., 1999). Essas subunidades codificadas pelas mitocôndrias são essenciais para a atividade do complexos respiratórios, uma característica também evidente na conservação de seqüências comparadas aos seus homólogos bacterianos. O genoma bacteriano codifica todas as proteínas não codificadas no mtDNA, sendo as proteínas codificadas pelo núcleo a vasta maioria — por exemplo, todas as proteínas do ciclo do ácido cítrico. As proteínas mitocondriais codificadas pelo núcleo são sintetizadas por ribossomas citosólicos e importadas via translocadores nas membranas mitocondriais externa e interna. Portanto, a fosforilação oxidativa depende da expressão de genes localizados em dois genomas separados. Qualquer mudança na expressão em resposta a um estímulo ou associada ao desenvolvimento precisa ser coordenada.

Enquanto a expressão de genes nucleares para proteínas mitocondriais parece ser regulada como outros genes nucleares, pouco se conhece sobre a regulação de genes mitocondriais. O círculo mestre do mtDNA vegetal é normalmente dividido em vários segmentos subgenômicos menores, e os genes podem ter suas expressões reduzidas por decréscimo no número de cópias para um segmento do mtDNA (Leon e cols., 1998). Os promotores gênicos no mtDNA são de vários tipos e mostram diferentes atividades de transcrição. Entretanto, um controle importante da expressão gênica mitocondrial parece ocorrer na pós-tradução, por degradação de polipeptídeos em excesso (McCabe e cols., 2000).

As plantas têm diversos mecanismos que reduzem a produção de ATP

Como foi visto, uma maquinaria complexa é necessária para uma eficiência alta na conservação de energia na fosforilação oxidativa. Assim, é talvez surpreendente que as mitocôndrias vegetais tenham diversas proteínas funcionais que reduzem esta eficiência. Provavelmente, as plantas são menos limitadas pela energia suprida (luz solar) do que por outros fatores no ambiente (p. ex., acesso a nitrogênio ou a fosfato). Como conseqüência, flexibilidade adaptativa pode ser mais importante do que eficiência energética.

Nas próximas subseções, será discutido o papel dos mecanismos não-fosforilantes e a possível utilidade dos mesmos na vida da planta.

A oxidase alternativa. Se for adicionado cianeto (1 m*M*) a tecidos animais respirando ativamente, a citocromo *c* oxidase é inibida e a taxa respiratória rapidamente cai para menos de 1% do seu nível inicial. No entanto, a maioria dos tecidos vegetais mostra um nível de respiração resistente ao cianeto, que pode representar de 10 a 25% e, em alguns tecidos, até 100% da taxa controle não-inibida. A enzima responsável por esta captura de oxigênio foi identificada como uma oxidase resistente ao cianeto, componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial das plantas, denominada **oxidase alternativa** (ver Figura 11.8 e **Tópico 11.3 na Internet**) (Vanlerberghe e McIntosh, 1997).

Os elétrons saem da cadeia principal de transporte de elétrons para a rota alternativa no nível do *pool* de ubiquinona (ver Figura 11.8). A oxidase alternativa, o único componente da rota alternativa, catalisa uma redução com quatro elétrons de oxigênio para água e é inibida especificamente por vários compostos, em especial o ácido salicil-hidroxâmico (SHAM).

Quando os elétrons passam da rota alternativa a partir do *pool* de ubiquinona, dois locais de bombeamento de prótons (nos complexos III e IV) são deixados de lado. Como não existe um local de conservação de energia na rota alternativa entre a ubiquinona e o oxigênio, a energia livre que normalmente seria conservada na forma de ATP é perdida como calor, quando os elétrons são desviados pela rota alternativa.

Como pode um processo que aparentemente desperdiça tanta energia quanto a rota alternativa contribuir para o metabolismo vegetal? Um exemplo da utilidade funcional da oxidase alternativa é sua atividade durante o desenvolvimento floral em certos membros de Araceae — por exemplo, o lírio vodu (*Sauromatum guttatum*). Um pouco antes da polinização, os tecidos da inflorescência em forma de bastão, chamada de *espádice*, que sustenta flores estaminadas e pistiladas, exibem um drástico aumento na taxa de respiração via rota alternativa. Como resultado, a temperatura da parte superior do espádice aumenta em até 25 °C acima da temperatura ambiente por um período de cerca de sete horas.

Durante essa extraordinária explosão de produção de calor, certas aminas, enóis e terpenos são volatilizados, e a planta, portanto, exala um odor pútrido que atrai insetos polinizadores. Ácido salicílico, um composto fenólico relacionado à aspirina (ver Capítulo 13), foi identificado como o sinal químico responsável por iniciar esse evento termogênico no lírio vodu. (Raskin e cols., 1989) (ver **Ensaio 11.3 na Internet**). Na maioria das plantas, no entanto, tanto as taxas respiratórias quanto a taxa de respiração resistente ao cianeto são baixas demais para gerar calor suficiente para aumentar significativamente a temperatura, de modo que qual(is) outro(s) papel(éis) é(são) desempenhado(s) pela rota alternativa?

Foi sugerido que a rota alternativa pode funcionar como uma rota de "escoamento energético", oxidando substratos respiratórios que se acumulam em excesso aos necessários para o crescimento, armazenagem ou síntese de ATP (Lambers, 1985). Esta visão sugere que os elétrons fluem pela rota alternativa somente quando a atividade da rota principal está saturada. Tal saturação é atingida em tubo de ensaio no estado 4 (ver Figura 11.9); *in vivo*, a saturação pode ocorrer se a taxa respiratória exceder a demanda celular por ATP (i. é, se os níveis de ADP forem muito baixos). No entanto, hoje está claro que a oxidase alternativa pode estar ativa antes que a rota do citocromo seja saturada. Assim, a oxidase alternativa possibilita à mitocôndria ajustar as taxas relativas de produção de ATP e síntese de esqueletos de carbono para uso nas reações biossintéticas.

Uma outra possível função da rota alternativa está na resposta das plantas a uma variedade de estresses (deficiência de fosfato, frio, seca, estresse osmótico e assim por diante), muitos dos quais podem inibir a respiração mitocondrial (ver Capítulo 25 e **Ensaio 11.1 na Internet**) (Wagner e Krab, 1995).

Por meio da drenagem de elétrons da cadeia de transporte de elétrons, a rota alternativa impede uma potencial super-redução do *pool* de ubiquinona (ver Figura 11.8), a qual, se deixada sem correção, pode levar à geração de espécies destrutivas de oxigênio reativo, como ânions superóxido e radicais hidroxila. Assim, a rota alternativa pode diminuir os efeitos prejudiciais do estresse na respiração (ver **Ensaio 11.4 na Internet**) (Wagner e Krab, 1995; Müller, 2001).

A proteína descopladora. Uma proteína encontrada na membrana interna das mitocôndrias de mamíferos, a **proteína desacopladora**, pode aumentar drasticamente a permeabilidade a prótons da membrana e, assim, agir como um desacoplador. Como resultado, menos ATP e mais calor são gerados. A produção de calor parece ser uma das principais funções da proteína desacopladora em células de mamíferos.

Por muito tempo pensou-se que a oxidase alternativa em plantas e a proteína desacopladora em mamíferos eram simplesmente duas maneiras de atingir o mesmo objetivo. Foi, portanto, surpreendente quando uma proteína similar à proteína desacopladora foi descoberta em mitocôndrias vegetais (Vercesi e cols., 1995; Laloi e cols., 1997). Esta proteína é induzida pelo estresse e, da mesma forma que a oxidase alternativa, pode funcionar para impedir uma super-redução da cadeia de transporte de elétrons (ver **Tópico 11.3 e Ensaio 11.4 na Internet**). Permanece obscuro, entretanto, por que as mitocôndrias vegetais requerem ambos os mecanismos.

A NADH desidrogenase interna, insensível à rotenona, ND_{in} (NADH). Esta é uma das múltiplas NAD(P)H desidrogenases encontradas nas mitocôndrias vegetais (ver Figura 11.8). Tem-se sugerido que ela funciona como um rota de desvio que não bombeia prótons, quando o complexo I está sobrecarregado. O complexo I tem uma afinidade maior por NADH (K_m 10 vezes menor) do que a NDin(NADH). A baixos níveis de NADH na matriz, tipicamente quando ADP está disponível (estado 3), o complexo I dominará. Enquanto que, quando o ADP está limitando o processo (estado 4), os níveis de NADH vão aumentar e a NDin(NADH)

será mais ativa. No entanto, a importância fisiológica desta enzima ainda não está esclarecida.

A respiração mitocondrial é controlada por metabólitos-chave

Os substratos para a síntese de ATP — ADP e Pi — parecem ser os reguladores-chave das taxas de glicólise no citosol, assim como do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Em todos os três estádios da respiração, há pontos de controle; aqui será apresentado apenas um pequeno panorama geral de algumas características importantes.

O sítio de regulação mais bem caracterizado no ciclo do ácido cítrico está no complexo da piruvato desidrogenase, que é reversivelmente fosforilado por uma quinase regulatória e uma fosfatase. A piruvato desidrogenase encontra-se inativa no estado fosforilado e a quinase reguladora é inibida pelo piruvato, permitindo a atividade da enzima quando o substrato está disponível (Figura 11.11). Além disso, várias enzimas do ciclo do ácido cítrico, incluindo piruvato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase, são diretamente inibidas por NADH.

As oxidações do ciclo do ácido cítrico e, subseqüentemente, a respiração são controladas de modo dinâmico pelo nível celular de adenina nucleotídeos. À medida que a demanda celular por ATP no citosol diminui em relação à taxa de síntese de ATP nas mitocôndrias, menos ADP estará disponível, e a cadeia de transporte de elétrons vai operar em taxa reduzida (ver Figura 11.10). Essa redução poderia ser sinalizada às enzimas do ciclo do ácido cítrico por um aumento no NADH matricial, inibindo a atividade de várias desidrogenases do ciclo do ácido cítrico (Oliver e McIntosh, 195).

O acúmulo de intermediários do ciclo do ácido cítrico e de seus derivados, como o citrato e o glutamato, inibe a ação da piruvato quinase citosólica, aumentando a concentração de PEP citosólico, que, por sua vez, reduz a taxa de conversão da frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bisfosfato, inibindo, assim, a glicólise.

Piruvato + CoA + NAD^+ ⟶ Acetil-CoA + CO_2 + NADH

Efeito na atividade da PDH	Mecanismo
Ativador	
Piruvato	Inibe a quinase
ADP	Inibe a quinase
Mg^{2+} (ou Mn^{2+})	Estimula a fosfatase
Inativador	
NADH	Inibe a PDH Estimula a quinase
Acetil CoA	Inibe a PDH Estimula a quinase
NH_4^+	Inibe a PDH Estimula a quinase

FIGURA 11.11 Regulação da atividade da piruvato desidrogenase (PDH) por fosforilação reversível e por outros metabólitos.

FIGURA 11.12 Conceito de regulação "de baixo para cima" (*bottom up*) da respiração vegetal. Diversos substratos para a respiração (p. ex., ADP) estimulam enzimas nas etapas iniciais das rotas (setas verdes). Ao contrário, o acúmulo de produtos (p. ex., ATP) inibe (quadrados vermelhos) de uma maneira gradativa as reações mais iniciais. Por exemplo, ATP inibe a cadeia de transporte de elétrons, levando a um acúmulo de NADH. NADH inibe enzimas do ciclo do ácido cítrico, como isocitrato desidrogenase e 2-oxoglutarato desidrogenase. Assim, os intermediários do ciclo do ácido cítrico inibem enzimas metabolizadoras do PEP no citosol. Por fim, PEP inibe a conversão de frutose-6-fosfato a frutose-1,6-bifosfato e restringe o fornecimento de carbono para a glicólise.

Em resumo, as taxas respiratórias das plantas são controladas "de baixo para cima", pelo nível celular de ADP (Figura 11.12). O ADP regula inicialmente a taxa de transferência de elétrons e síntese de ATP, que, por sua vez, regula a atividade do ciclo do ácido cítrico, a qual, finalmente, regula a taxa das reações glicolíticas.

A respiração é fortemente acoplada a outras rotas

A glicólise, a rota das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico são ligados a várias outras rotas metabólicas importantes, algumas das quais vão ser tratadas com mais detalhes no Capítulo 13. As rotas respiratórias são fundamentais para a produção de uma grande variedade de metabólitos vegetais, incluindo aminoácidos, lipídeos e compostos relacionados, isoprenóides e porfirinas (Figura 11.13). De fato, muito do carbono reduzido que é metabolizado na glicólise e no ciclo do ácido cítrico é desviado para fins biossintéticos e não-oxidado a CO_2.

RESPIRAÇÃO EM PLANTAS E TECIDOS INTACTOS

Muitos estudos proveitosos da respiração vegetal e sua regulação foram desenvolvidos em organelas isoladas e em extratos livres de células de tecidos vegetais. Mas como este conhecimento se relaciona à função da planta como um todo em condições naturais ou agrícolas?

Nesta seção, será examinada a respiração e a função mitocondrial no contexto da planta toda, sob uma variedade de condições. Primeiro, quando tecidos verdes são expostos à luz, a respiração e a fotossíntese operam simultaneamente e interagem de maneiras complexas. A seguir, serão discutidas as diferentes taxas de respiração dos tecidos, as quais podem estar sob controle do desenvolvimento, assim como o interessante caso de esterilidade masculina citoplasmática. Por fim, será analisada a influência de vários fatores ambientais sobre taxas respiratórias.

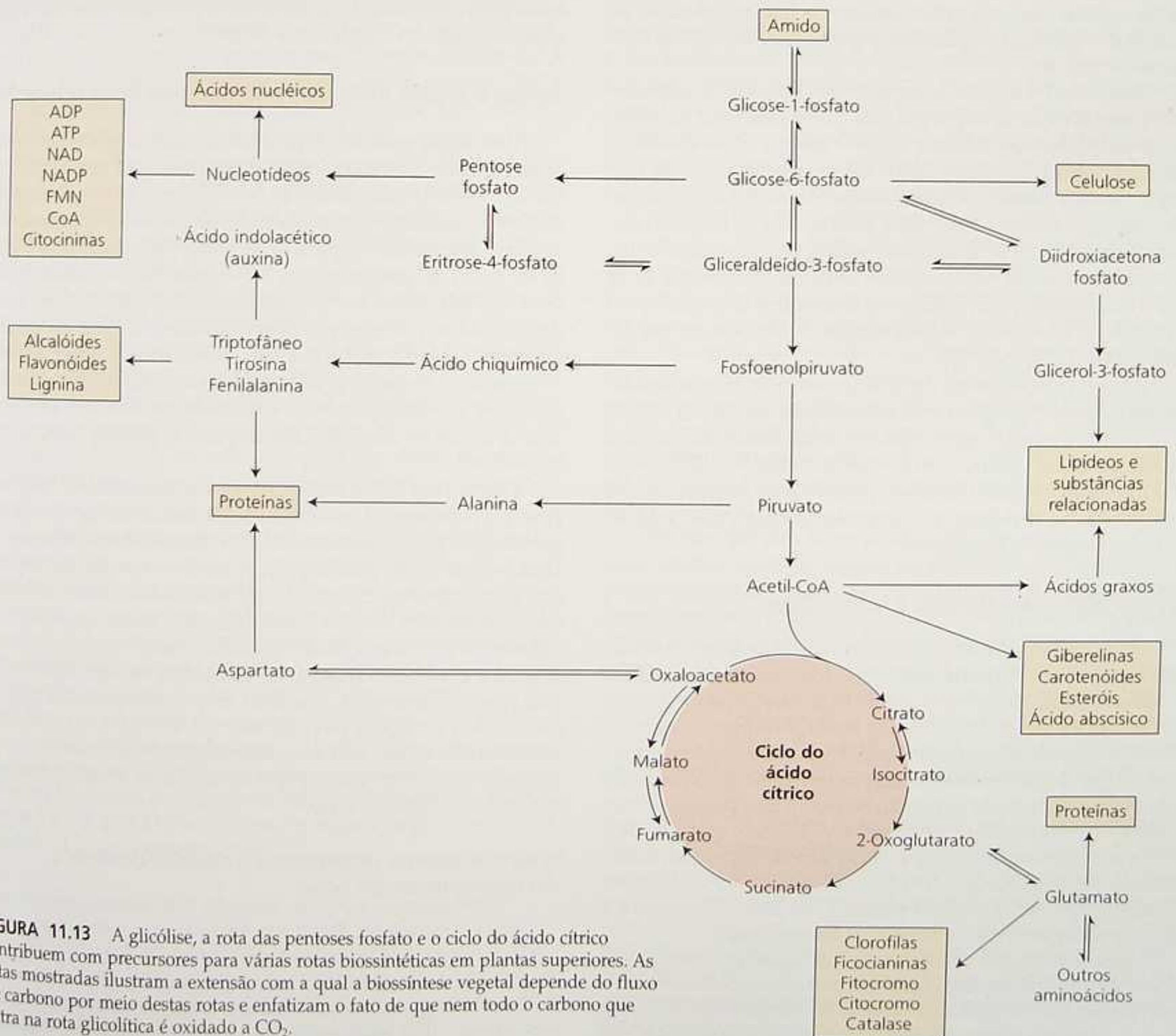



FIGURA 11.13 A glicólise, a rota das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico contribuem com precursores para várias rotas biossintéticas em plantas superiores. As rotas mostradas ilustram a extensão com a qual a biossíntese vegetal depende do fluxo de carbono por meio destas rotas e enfatizam o fato de que nem todo o carbono que entra na rota glicolítica é oxidado a CO_2.

As plantas respiram aproximadamente metade da produção fotossintética diária

Muitos fatores podem afetar a taxa de respiração de plantas intactas ou de seus órgãos individuais. Fatores relevantes incluem a espécie e o hábito de crescimento da planta, o tipo e idade do órgão específico, além de variáveis ambientais, como a concentração externa de oxigênio, a temperatura e o suprimento de nutrientes e água (ver Capítulo 25, **Tópico 11.7 na Internet** e **Ensaio 11.5 na Internet**).

As taxas respiratórias da planta inteira, particularmente quando consideradas com base na matéria fresca, são em geral menores do que as taxas respiratórias encontradas em tecidos animais, diferença que se deve, em grande parte, à presença, em células vegetais, de grandes compartimentos de vacúolo central e de parede celular, nenhum deles contendo mitocôndrias. No entanto, as taxas respiratórias em alguns tecidos vegetais são tão altas quanto as observadas em tecidos animais que respiram ativamente, de modo que o processo respiratório vegetal não é inerentemente mais lento do que a respiração em animais. Na verdade, mitocôndrias vegetais isoladas respiram mais rapidamente que mitocôndrias de mamíferos, quando a respiração é expressa por unidade de miligrama de proteína.

Embora as plantas via de regra tenham baixas taxas respiratórias, a contribuição da respiração para a economia geral de carbono da planta pode ser substancial (ver **Tópico 11.7 na Internet**). Enquanto apenas os tecidos verdes fotossintetizam, todos os tecidos respiram, e o fazem 24 horas por dia. Mesmo em tecidos fotossinteticamente ativos, a respiração, se integrada ao longo do dia, pode representar uma fração considerável da fotossíntese bruta. Um levantamento de várias espécies herbáceas indicou que de 30 a 60% do ganho diário de carbono na fotossíntese foi perdido para a respiração, embora tais valores tendam a diminuir em plantas mais velhas (Lambers, 1985).

Árvores jovens perdem cerca de um terço de seus fotossintatos diários pela respiração, perda esta que pode dobrar em árvores mais velhas, à medida que a razão de tecido fotossintético para não-fotossintético diminui. Em árvores tropicais, 70 a 80% do ganho fotossintético diário pode ser perdido para a respiração em decorrência das altas taxas de respiração no escuro associadas às elevadas temperaturas noturnas.

A respiração opera durante a fotossíntese

As mitocôndrias estão envolvidas no metabolismo de folhas fotossintetizantes. A glicina gerada pela fotorrespiração é oxidada à serina na mitocôndria (ver Capítulo 8). Ao mesmo tempo, as mitocôndrias em tecido fotossintético também realizam respiração via ciclo do ácido cítrico (geralmente chamada de *respiração no escuro* porque ela não necessita de luz). Em relação à taxa máxima de fotossíntese, as taxas de respiração no escuro medidas em tecidos verdes são muito menores, geralmente por um fator que varia de 6 a 20 vezes. Considerando que as taxas de fotorrespiração podem comumente atingir de 20 a 40% da taxa fotossintética bruta, a respiração mitocondrial mediada pelo ciclo do ácido cítrico opera a taxas também bem abaixo daquela de fotorrespiração.

Uma questão que não tem sido adequadamente respondida concerne a quanta respiração mitocondrial (desconsiderando o envolvimento das mitocôndrias no ciclo fotorrespiratório de oxidação do carbono) opera simultaneamente com a fotossíntese em tecidos verdes iluminados. A atividade da piruvato desidrogenase, uma das portas de entrada no ciclo do ácido cítrico, decresce, na luz, a 25% de sua atividade no escuro (Budde e Randall, 1990). A taxa geral de respiração decresce na luz, mas a extensão do decréscimo permanece incerta até o momento. É claro, no entanto, que a mitocôndria é um importante fornecedor de ATP ao citosol, mesmo em folhas iluminadas (Krömer, 1995).

Um outro papel da respiração mitocondrial durante a fotossíntese é suprir metabólitos de carbono para reações biossintéticas — por exemplo, pela formação de 2-oxoglutarato necessário à assimilação do nitrogênio. Mitocôndrias foliares tipicamente têm altas capacidades das taxas não-fosforilantes na cadeia de transporte de elétrons. Oxidando NADH com menor produção de ATP, as mitocôndrias podem manter uma maior produção de 2-oxoglutarato pelas rotas respiratórias, sem estarem restritas pela demanda citosólica por ATP (ver Figuras 11.7C e 11.12) (Hoefnagel e cols., 1998; Noctor e Foyer, 1998).

Evidência adicional do envolvimento da respiração mitocondrial em folhas fotossintetizantes foi obtida em estudos com mutantes mitocondriais, deficientes nos complexos respiratórios, mostrando que o desenvolvimento foliar e a fotossíntese são negativamente afetados (Vedel e cols., 1999).

Tecidos e órgãos diferentes respiram com taxas diferentes

Uma regra geral útil é que quanto maior a atividade metabólica geral de um determinado tecido, maior sua taxa respiratória. Gemas em desenvolvimento normalmente mostram taxas de respiração maiores (por unidade de massa seca), e as taxas de respiração de tecidos vegetativos normalmente decrescem a partir do ponto de crescimento (p. ex., o ápice foliar em dicotiledôneas e a base foliar em monocotiledôneas) para regiões mais diferenciadas. Um exemplo bem estudado é a folha de cevada em crescimento (Thompson e cols., 1998). Em tecidos vegetativos maduros, os caules geralmente têm as menores taxas de respiração, e as respirações foliar e radicular variam com a espécie vegetal e com as condições sob as quais as plantas estão se desenvolvendo.

Quando um tecido vegetal atinge a maturidade, sua taxa respiratória permanecerá mais ou menos constante ou diminuirá vagarosamente à medida que o tecido envelhece e finalmente senesce. Uma exceção a este padrão é um acentuado aumento na respiração, conhecido como *climatérico*, que acompanha o início do amadurecimento em muitas frutas (abacate, maçã, banana) e a senescência em folhas e flores destacadas. Tanto o amadurecimento quanto o aumento respiratório climatérico são desencadeados pela produção endógena de etileno, assim como por uma aplicação exógena de etileno (ver Capítulo 22). Em geral, a respiração induzida pelo etileno está associada a uma rota alternativa ativa, resistente ao cianeto, mas o papel desta rota no amadurecimento não está claro (Tucker, 1993).

O funcionamento mitocondrial é decisivo durante o desenvolvimento do pólen

Uma característica fisiológica diretamente ligada ao genoma mitocondrial vegetal é um fenômeno conhecido como **esterilidade masculina citoplasmática** ou *cms* (do inglês, *cytoplasmic male sterility*). Linhagens de plantas que mostram *cms* não formam pólens viáveis — por isto a designação *esterilidade masculina*. O termo

citoplasmático aqui se refere ao fato de que esta característica é transmitida de forma não-mendeliana; o genótipo *cms* é sempre herdado da mãe com o genoma mitocondrial. A *cms* é uma característica muito importante em cruzamentos vegetais, pois uma linhagem com esterilidade masculina estável pode facilitar a produção de estoques de sementes híbridas. Para tal uso, características *cms* que não produzem nenhum grande efeito ao longo do ciclo de vida da planta, exceto pela esterilidade masculina, têm sido encontradas em muitas espécies.

Todas as plantas portadoras da característica *cms* que foram caracterizadas em nível molecular mostram a presença de rearranjos distintos em seus mtDNA, em relação às plantas selvagens. Estes rearranjos criam novas regiões codificantes e têm sido fortemente correlacionados com fenótipos *cms* em vários sistemas. Genes nucleares restauradores podem superar os efeitos dos rearranjos do mtDNA e restabelecer a fertilidade a plantas com genótipo *cms*. Tais genes restauradores são essenciais para a utilização comercial de sementes *cms*, se estas são os produtos da colheita.

Uma conseqüência interessante do uso do gene *cms* ocorreu no final da década de 1960, quando 85% do milho híbrido para ração cultivado nos Estados Unidos eram derivados do uso de uma linhagem *cms* de milho chamada de *cms*-T (Texas). No milho *cms*-T, os rearranjos do mtDNA geraram uma proteína singular de 13 kDa, a URF13 (Levings e Siedow, 1992). Como a proteína URF13 age para provocar a esterilidade masculina não se sabe, mas, no final da década de 1960, apareceu uma doença causada por uma raça do fungo *Bipolaris maydis* (também chamada *Cochliobolus heterostrophus*). Essa raça específica sintetiza um composto (toxina HmT), que interage especificamente com a proteína URF13 para produzir poros na membrana mitocondrial interna, resultando na perda da permeabilidade seletiva.

A interação entre a toxina HmT e URF13 fez de *Bipolaris maydis* um patógeno sobremaneira virulento no milho *cms*-T e levou a uma epidemia nas regiões de cultivo de milho dos Estados Unidos, conhecida como a queima sulina da folha do milho. Como resultado dessa epidemia, o uso de *cms*-T na produção de milho híbrido foi suspenso. Nenhum outro milho *cms* mostrou ser uma alternativa adequada, de modo que a atual produção de semente de milho híbrido voltou ao procedimento manual de remoção do pendão, que impede a autopolinização.

Comparada com outros órgãos, a quantidade de mitocôndrias por célula e a expressão de proteínas respiratórias são muito altas em anteras em desenvolvimento, onde o desenvolvimento do pólen é um processo que demanda energia (Huang e cols., 1994). A esterilidade masculina é um fenótipo comum de mutações em genes mitocondriais para subunidades dos complexos da fosforilação oxidativa (Vedel e cols., 1999). Tais mutantes podem ser viáveis devido à existência das rotas respiratórias não-fosforilantes.

A **morte celular programada** (do inglês **PCD**, *programmed cell death*) é parte do desenvolvimento normal das anteras. Existem hoje evidências de que as mitocôndrias estão envolvidas na PCD vegetal e que a PCD é prematura em anteras de girassol *cms* (ver **Ensaio 11.6 na Internet**).

Os fatores ambientais alteram as taxas respiratórias

Diversos fatores ambientais podem alterar a operação de rotas metabólicas e de taxas respiratórias. Aqui, serão examinados os papéis do oxigênio (O_2), da temperatura e do dióxido de carbono (CO_2) ambientais.

Oxigênio. O oxigênio pode afetar a respiração vegetal devido ao seu papel como substrato no processo como um todo. A 25° C, a concentração de equilíbrio do O_2 em uma solução aquosa saturada de ar (21% O_2) é de aproximadamente 250 m*M*. O valor de K_m para o oxigênio na reação catalisada pela citocromo *c* oxidase é bem abaixo de 1 μ*M*, de modo que não deveria haver dependência aparente da taxa respiratória das concentrações externas de O_2 (ver **Capítulo 2 na Internet** para uma discussão sobre K_m). No entanto, as taxas respiratórias decrescem se a concentração atmosférica de oxigênio fica abaixo de 5% para tecidos inteiros ou abaixo de 2 a 3% para fatias de tecidos. Tais observações mostram que a difusão de oxigênio pela fase aquosa dos tecidos impõe uma limitação à respiração.

A limitação na difusão imposta por uma fase aquosa enfatiza a importância dos espaços intercelulares de aeração encontrados em tecidos vegetais para a disponibilidade de oxigênio nas mitocôndrias. Se não houvesse uma rota de difusão gasosa pela planta, as taxas de respiração celular de muitas plantas seriam limitadas por um suprimento insuficiente de oxigênio (ver **Ensaio 11.3 na Internet**)

Saturação de água/baixo O_2. Limitações na difusão são ainda mais significativas quando os órgãos vegetais estão crescendo em um meio aquoso. Quando as plantas são cultivadas hidroponicamente, as soluções precisam ser vigorosamente arejadas para manter altos níveis de oxigênio nas vizinhanças das raízes. O problema da disponibilidade de oxigênio também surge em plantas que crescem em solos muito úmidos ou alagados (ver Capítulo 25).

Algumas plantas, particularmente as árvores, têm uma distribuição geográfica restrita, devido à necessidade de manterem um suprimento de oxigênio às raízes. Por exemplo, *Cornus florida* e *Liriodendron tulipifera* podem sobreviver apenas em solos bem drenados e arejados, pois suas raízes não podem tolerar mais do que uma exposição limitada a condições de alagamento. Por outro lado, muitas espécies vegetais estão adaptadas a crescerem em solos alagados. Espécies herbáceas, como o arroz e o girassol, freqüentemente dependem de uma rede de espaços intercelulares (aerênquima) estendendo-se das folhas às raízes para fornecer uma rota gasosa contínua para o movimento de oxigênio às raízes alagadas.

Árvores que têm raízes muito profundas e que crescem em solos úmidos sofrem limitações no suprimento de oxigênio que podem ser severas. Tais raízes precisam sobreviver com metabolismo anaeróbico (fermentativo) ou desenvolver estruturas que facilitem o movimento de oxigênio até as raízes. Exemplos de tais estruturas são projeções radiculares, chamadas de *pneumatóforos*, que se projetam para fora da água e proporcionam uma rota gasosa para a difusão do oxigênio para dentro das raízes. Os pneumatóforos são encontrados em *Avicennia* e *Rhizophora*, árvores que crescem em mangues sob condições de alagamento contínuo.

Temperatura. A respiração tipicamente aumenta com a temperatura (ver, entretanto, **Ensaio 11.3 na Internet**). Entre 0 e 30 °C, o aumento na taxa respiratória para cada 10 °C de aumento na temperatura ambiente (comumente chamado de coeficiente de temperatura, adimensional, Q_{10}) é de cerca de 2. Acima de 30 °C, a taxa respiratória em geral aumenta mais vagarosamente, atinge um platô entre 40 e 50 °C e decresce a temperaturas maiores. Acredita-se que temperaturas noturnas elevadas explicam as altas taxas respiratórias de plantas tropicais.

As temperaturas baixas são utilizadas para retardar as taxas respiratórias pós-colheita durante a estocagem de frutas e verduras. No entanto, podem surgir complicações decorrentes desta armazenagem. Por exemplo, quando tubérculos de batata são armazenados a temperaturas superiores a 10° C, a respiração e as atividades metabólicas ancilares são suficientes para permitir brotação. Abaixo de 5° C, as taxas respiratórias e a brotação são reduzidas na maioria dos tecidos, mas a degradação do amido armazenado e sua conversão a sacarose conferem uma doçura indesejável aos tubérculos. Como meio termo, as batatas são armazenadas entre 7 e 9 °C, o que impede a quebra do amido e, ao mesmo tempo, minimiza a respiração e a germinação.

Concentração de CO_2. É prática comum na armazenagem comercial de frutas tirar vantagem dos efeitos do oxigênio atmosférico e da temperatura na respiração e estocar frutas a baixas temperaturas, sob 2 a 3% de oxigênio e de 3 a 5% de CO_2. A temperatura baixa reduz a taxa respiratória, assim como a redução do oxigênio. Em vez de condições anóxicas, são usados baixos níveis de oxigênio, para impedir que as tensões de oxigênio nos tecidos baixem ao ponto de estimular o metabolismo fermentativo.

O dióxido de carbono tem um efeito inibitório direto muito limitado sobre a taxa respiratória em concentrações entre 3 a 5%, que estão bem além da concentração de 0,036% (360 ppm) normalmente encontrada na atmosfera. A concentração atmosférica de CO_2 está aumentando rapidamente como resultado de atividades humanas, projetando-se uma duplicação, para 700 ppm, antes do final do século XXI (ver Capítulo 9).

Comparadas a plantas cultivadas a 350 ppm de CO_2, as plantas cultivadas a 700 ppm de CO_2 apresentaram uma taxa de respiração mitocondrial (expressa por unidade de massa seca) 20% mais lenta (Drake e cols., 1999), mas isto foi questionado (Jahnke, 2001; Bruhn e cols., 2002). O número de mitocôndrias por unidade de área celular na verdade dobra no ambiente rico em CO_2. Tais dados implicam que a atividade respiratória na luz é que pode aumentar em concentrações de CO_2 mais elevadas (Griffin e cols., 2001). Assim, hoje é um assunto em debate, como as plantas que crescem em concentrações elevadas de CO_2 vão contribuir para o ciclo global de carbono.

METABOLISMO DE LIPÍDEOS

Enquanto os animais utilizam as gorduras para a armazenagem de energia, as plantas as utilizam principalmente para armazenar carbono. Gorduras e óleos são formas importantes de armazenagem de carbono reduzido em muitas sementes, incluindo aquelas de espécies agronomicamente importantes, como soja, girassol, amendoim e algodão. Os óleos têm uma grande função de armazenagem em plantas não-domesticadas que produzem sementes pequenas. Alguns frutos, como abacates e azeitonas, também armazenam gorduras e óleos.

Na parte final deste capítulo, será apresentada a biossíntese de dois tipos de glicerolipídeos: os *triacilgliceróis* (as gorduras e óleos estocados em sementes) e os *glicerolipídeos polares* (que formam as bicamadas lipídicas das membranas celulares) (Figura 11.14). Ver-se-á que a biossíntese de triacilgliceróis e de glicerolipídeos polares requer a cooperação de duas organelas: os plastídeos e o retículo endoplasmático. As plantas também podem usar as gorduras e óleos para produção de energia. O processo complexo pelo qual sementes em germinação obtêm energia metabólica a partir da oxidação de gorduras e óleos será também examinado.

Gorduras e óleos armazenam grandes quantidades de energia

As gorduras e os óleos pertencem à classe geral dos *lipídeos*, um grupo estruturalmente diverso de compostos hidrofóbicos, solúveis em solventes orgânicos e altamente insolúveis em água. Os lipídeos representam uma forma de carbono mais reduzida que os carboidratos, de modo que a oxidação completa de 1 g de gordura ou óleo (que contém cerca de 40 kJ ou 9,3 kcal de energia) pode produzir consideravelmente mais ATP que a oxidação de 1 g de amido (cerca de 15,9 kJ ou 3,8 kcal). Por outro lado, a biossíntese de gorduras, óleos e moléculas relacionadas, como os fosfolipídeos de membranas, requer um investimento correspondentemente grande de energia metabólica.

Outros lipídeos são importantes para a estrutura e o funcionamento das plantas, mas não são utilizados para armazenagem de energia, os quais incluem as ceras, que constituem a cutícula protetora que reduz a perda de água de tecidos expostos, e os terpenóides (também conhecidos como isoprenóides), que incluem os carotenóides envolvidos na fotossíntese e os esteróis presentes em muitas membranas vegetais (ver Capítulo 13).

Os triacilgliceróis são armazenados em oleossomos

As gorduras e os óleos existem principalmente na forma de triacilgliceróis (*acil* refere-se à porção de ácido graxo) ou triglicerídeos, nos quais as moléculas de ácidos graxos são unidas por ligações ésteres aos três grupos hidroxilas do glicerol (ver Figura 11.14).

Os ácidos graxos em plantas são normalmente ácidos carboxílicos de cadeia reta com um número par de átomos de carbono. As cadeias de carbono podem ser tão curtas quanto de 12 unidades ou tão longas quanto de 20, mas mais comumente elas têm 16 ou 18 carbonos de extensão. Os *óleos* são líquidos à temperatura ambiente, principalmente devido à presença de ligações não-saturadas nos seus ácidos graxos componentes; as *gorduras*, que têm uma proporção maior de ácidos graxos saturados, são sólidas à temperatura ambiente. Os principais ácidos graxos nos lipídeos vegetais são mostrados na Tabela 11.3.

A composição dos ácidos graxos nos lipídeos vegetais varia com a espécie. Por exemplo, o óleo de amendoim é 9% ácido palmítico, 59% ácido oléico e 21% ácido linoléico, enquanto o óleo de semente de algodão é 20% ácido palmítico, 30% ácido oléico e 45% ácido linoléico. A biossíntese desses ácidos graxos será discutida em breve.

Na maioria das sementes, os triacilgliceróis são armazenados no citoplasma das células do cotilédone ou endosperma, em organelas conhecidas como **oleossomos** (também chamadas de *esferossomos* ou *corpos lipídicos*) (ver Capítulo 1). Os oleossomos têm uma barreira de membrana pouco usual, que separa os triglicerídeos do citoplasma aquoso. Uma camada única de fosfolipídeos (i. é, uma meia bicamada) circunda o corpo lipídico, com as extremidades hidrofílicas dos fosfolipídeos expostas ao citosol e as cadeias hidrofóbicas de hidrocarbonetos acil para o interior de triacilgliceróis (ver Capítulo 1). O oleossomo é estabilizado pela presença de proteínas específicas, denominadas *oleosinas*, que cobrem a superfície e impedem que os fosfolipídeos de corpos lipídicos adjacentes entrem em contato e se fusionem.

CH_2OH
|
$CHOH$
|
CH_2OH

Glicerol

$H_2C - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - (CH_2)_n - CH_3$
|
$HC - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - (CH_2)_n - CH_3$
|
$H_2C - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - (CH_2)_n - CH_3$

Triacilglicerol
(o principal lipídeo armazenado)

$H_2C - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - (CH_2)_n - CH_3$
|
$HC - O - \overset{O}{\overset{\|}{C}} - (CH_2)_n - CH_3$
|
$H_2C - O - X$

Glicerolipídeo

X = H	Diacilglicerol (DAG)
$X = HPO_3^{2-}$	Ácido fosfatídico
$X = PO_3^{2-} - CH_2 - CH_2 - \overset{+}{N}(CH_3)_3$	Fosfatidilcolina
$X = PO_3^{2-} - CH_2 - CH_2 - NH_2$	Fosfatidiletanolamina
X = galactose	Galactolipídeos

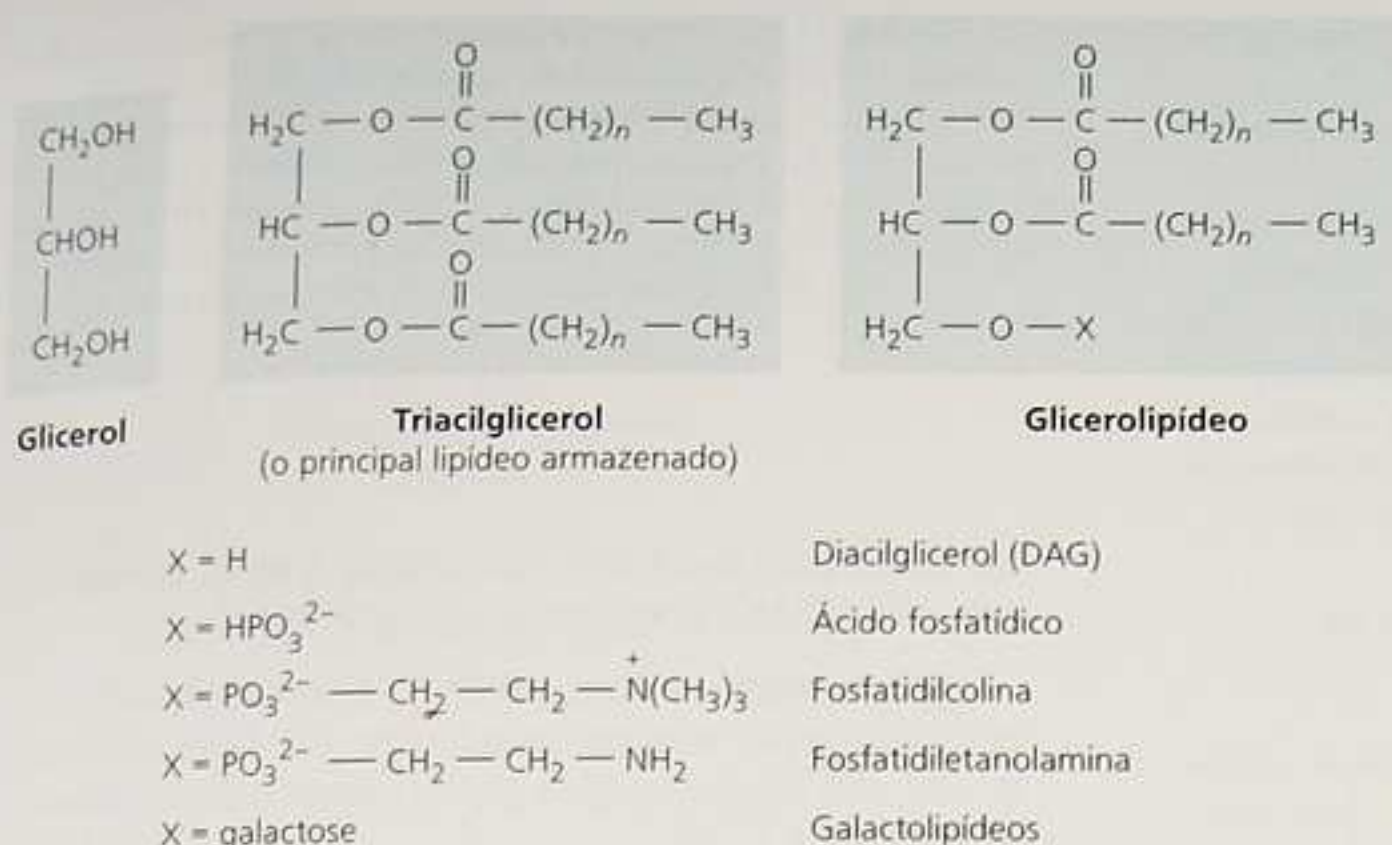



FIGURA 11.14 Características estruturais de triacilgliceróis e glicerolipídeos polares em vegetais superiores. Os comprimentos das cadeias de carbono dos ácidos graxos, os quais sempre têm um número par de carbonos, variam de 12 a 20, mas são tipicamente 16 ou 18. Assim, o valor de *n* é normalmente 14 ou 16.

Esta estrutura de membrana singular dos oleossomos resulta do padrão de biossíntese dos triacilgliceróis, cuja síntese é completada por enzimas localizadas nas membranas do retículo endoplasmático, acumulando-se as gorduras resultantes entre duas monocamadas da bicamada da membrana do retículo endoplasmático. A bicamada intumesce e se separa à medida que mais gorduras são adicionadas à estrutura em crescimento e, por fim, um corpo lipídico maduro solta-se do retículo endoplasmático (Napier e cols., 1996).

Os glicerolipídeos polares são os principais lipídeos estruturais nas membranas

Conforme descrito no Capítulo 1, cada membrana na célula é uma bicamada de moléculas *anfipáticas* (i. é, tendo tanto regiões hidrofílicas quanto hidrofóbicas) de lipídeos, nas quais um grupo polar da extremidade interage com a fase aquosa, enquanto as cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos formam o centro da membrana. Este miolo hidrofóbico impede a difusão aleatória de solutos entre os compartimentos celulares e, portanto, permite que a bioquímica da célula seja organizada.

Os principais lipídeos estruturais nas membranas são os glicerolipídeos polares (ver Figura 11.14), nos quais a porção hidrofóbica consiste de duas cadeias de ácidos graxos de 16 ou 18 carbonos esterificadas nas posições 1 e 2 de uma estrutura de glicerol. O grupo terminal polar está ligado à posição 3 do glicerol. Existem duas categorias de glicerolipídeos polares:

1. **Gliceroglicolipídeos**, nos quais os açúcares formam a o grupo terminal (Figura 11.15A)
2. **Glicerofosfolipídeos**, nos quais o grupo terminal contém fosfato (Figura 11.15B)

As membranas vegetais possuem lipídeos estruturais adicionais, incluindo esfingolipídeos e esteróis (ver Capítulo 13), os quais, todavia, são componentes minoritários. Outros lipídeos desempenham papéis específicos na fotossíntese e em outros processos, dentre os quais estão clorofilas, plastoquinona, carotenóides e

TABELA 11.3
Ácidos graxos comuns em tecidos de vegetais superiores

Nome[a]	Estrutura
Ácidos graxos saturados	
Ácido láurico (12:0)	$CH_3(CH_2)_{10}CO_2H$
Ácido mirístico (14:0)	$CH_3(CH_2)_{12}CO_2H$
Ácido palmítico (16:0)	$CH_3(CH_2)_{140}CO_2H$
Ácido esteárico (18:0)	$CH_3(CH_2)_{16}CO_2H$
Ácidos graxos insaturados	
Ácido oléico (18:1)	$CH_3(CH_2)_7CH—CH(CH_2)_7CO_2H$
Ácido linoléico (18:2)	$CH_3(CH_2)_4CH—CH—CH_2—CH—CH(CH_2)_7CO_2H$
Ácido linolênico (18:3)	$CH_3CH_2CH—CH—CH_2—CH—CH—CH_2—CH—CH—(CH_2)_7CO_2H$

[a]Cada ácido graxo tem uma abreviatura numérica. O número antes dos dois pontos representa o número total de carbonos; o número depois dos dois pontos é o número de ligações duplas.

tocoferóis, que juntos contabilizam um terço dos lipídeos das folhas dos vegetais.

A Figura 11.15 mostra as nove classes principais de glicerolipídeos nas plantas, cada uma delas associada a várias combinações diferentes de ácidos graxos. As estruturas mostradas na Figura 11.15 ilustram algumas das espécies moleculares mais comuns.

As membranas dos cloroplastos, que contabilizam 70% dos lipídeos de membrana em tecidos fotossintéticos, são dominadas por gliceroglicolipídeos; outras membranas da célula contêm glicerofosfolipídeos (Tabela 11.14). Em tecidos não-fotossintéticos, os fosfolipídeos são os principais glicerolipídeos de membrana.

A biossíntese de ácidos graxos consiste de ciclos de adição de dois carbonos

A biossíntese de ácidos graxos envolve a condensação cíclica de unidades de dois carbonos nas quais acetil-CoA é o precursor. Em plantas, os ácidos graxos são sintetizados exclusivamente nos plastídeos; em animais, os ácidos graxos são sintetizados sobretudo no citosol.

Acredita-se que as enzimas da rota são mantidas juntas em um complexo que é coletivamente conhecido como *ácido graxo sintase*. O complexo provavelmente permite que a série de reações ocorra mais eficientemente do que ocorreria se as enzimas fossem fisicamente separadas umas das outras. Além disso, as cadeias acil em crescimento são ligadas covalentemente a uma proteína acídica de baixo peso molecular, denominada **proteína carregadora de acil** (do inglês **ACP**, *acyl carrier protein*). Quando conjugada à proteína carregadora acil, a cadeia de ácidos graxos é chamada de **acil-ACP**.

A primeira etapa comprometida com a rota (i. é, a primeira etapa específica à síntese de ácidos graxos) é a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA e CO_2 pela enzima acetil-CoA carboxilase (Figura 11.16) (Sasaki e cols., 1995). A forte regulação da acetil-CoA carboxilase parece controlar a taxa global de síntese de ácidos graxos (Ohlrogge e Jaworski, 1997). O malonil-CoA, então, reage com ACP, gerando malonil-ACP:

1. No primeiro ciclo da síntese de ácidos graxos, o grupo acetato do acetil-CoA é transferido a uma cisteína específica da *enzima condensadora* (3-cetoacil-ACP sintase) e, então, combinado com malonil-ACP para formar acetoacetil-ACP.
2. A seguir, o grupo ceto no carbono 3 é removido (reduzido) pela ação de três enzimas, para formar uma nova cadeia acil (butiril-ACP), que tem agora quatro carbonos de comprimento (ver Figura 11.16).
3. O ácido de quatro carbonos e uma outra molécula de malonil-ACP tornam-se, então, os novos substratos para a enzima condensadora, resultando na adição de outra unidade de dois carbonos à cadeia em crescimento, e o ciclo continua até que 16 ou 18 carbonos tenham sido adicionados.
4. Alguns 16:0-ACP são liberados da maquinaria da ácido-graxo sintase, mas a maioria das moléculas que são alongadas para 18:0-ACP é eficientemente convertida a 18:1-ACP por uma enzima dessaturase. A repetição desta seqüência de eventos faz do 16:0-ACP e do 18:0-ACP os principais produtos da síntese de ácidos graxos em plastídeos (Figura 11.17).

Os ácidos graxos podem ser submetidos a modificações subseqüentes, após serem ligados ao glicerol para formar glicerolipídeos. Ligações duplas adicionais são inseridas nos ácidos graxos 16:0 e 18:1 por uma série de isoenzimas dessaturases, que são proteínas integrais de membrana encontradas no cloroplasto e no retículo endoplasmático. Cada dessaturase insere uma ligação dupla em uma posição específica na cadeia de ácidos graxos, e as enzimas agem seqüencialmente para formar os produtos 18:3 e 16:3 finais (Ohlrogge e Browse, 1995).

FIGURA 11.15 Principais lipídeos polares de membranas vegetais: (A) gliceroglicolipídeos e (B) glicerofosfolipídeos. Pelo menos seis ácidos graxos diferentes podem ser ligados à estrutura de glicerol. Uma das espécies moleculares mais comuns é mostrada para cada lipídeo. Os números abaixo de cada nome referem-se ao número de carbonos (número antes dos dois pontos) e ao número de ligações duplas (número após os dois pontos). ▶

TABELA 11.4
Componentes glicerolipídicos das membranas celulares

	Composição lipídica (porcentagem do total)		
	Cloroplasto	Retículo endoplasmático	Mitocôndria
Fosfatidilcolina	4	47	43
Fosfatidiletanolamina	—	34	35
Fosfatidilinositol	1	17	6
Fosfatidilglicerol	7	2	3
Difosfatidilglicerol	—	—	13
Monogalactosildiacilglicerol	55	—	—
Digalactosildiacilglicerol	24	—	—
Sulfolipídeo	8	—	—

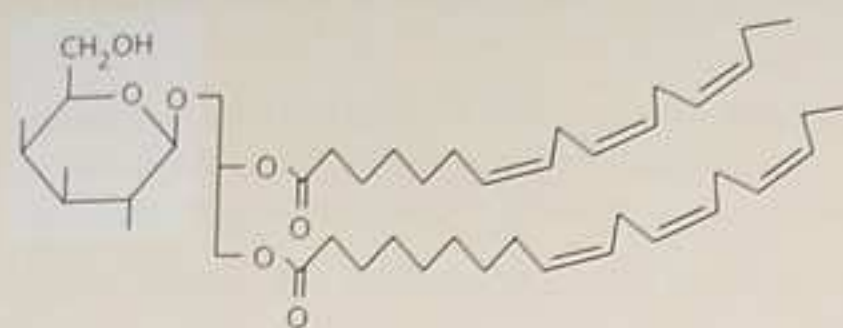
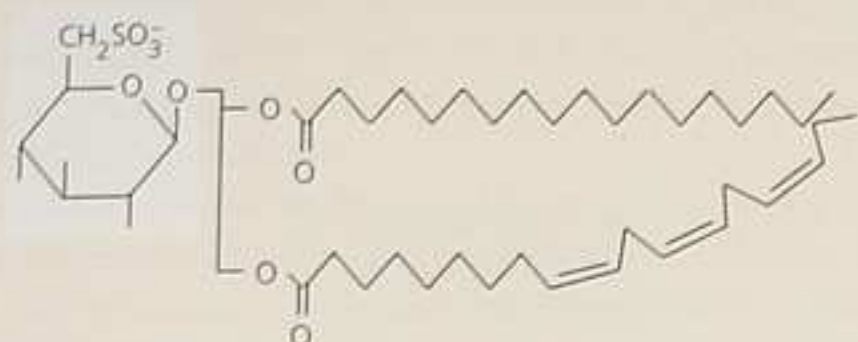
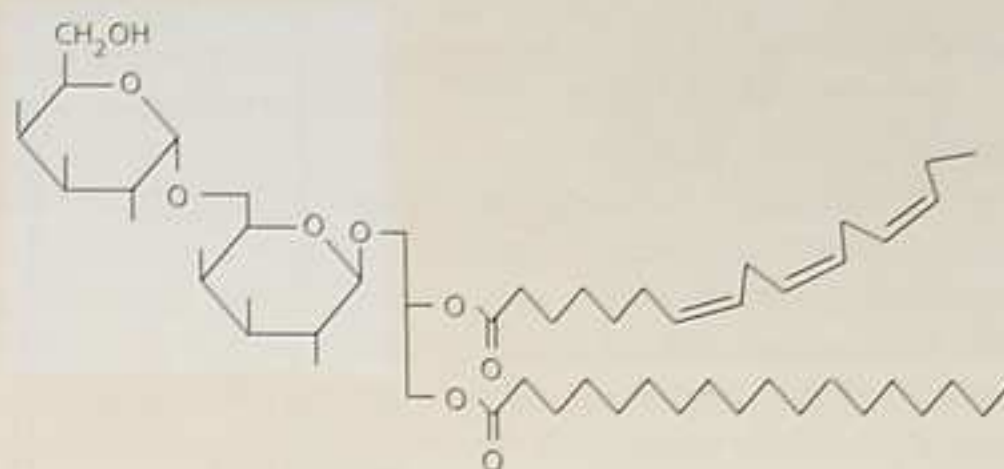
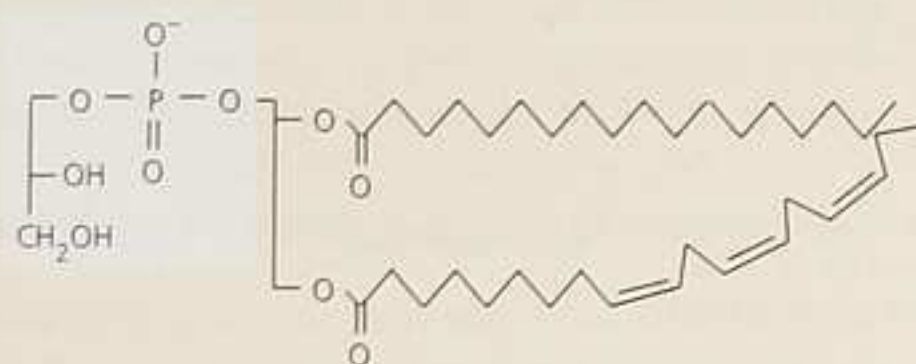
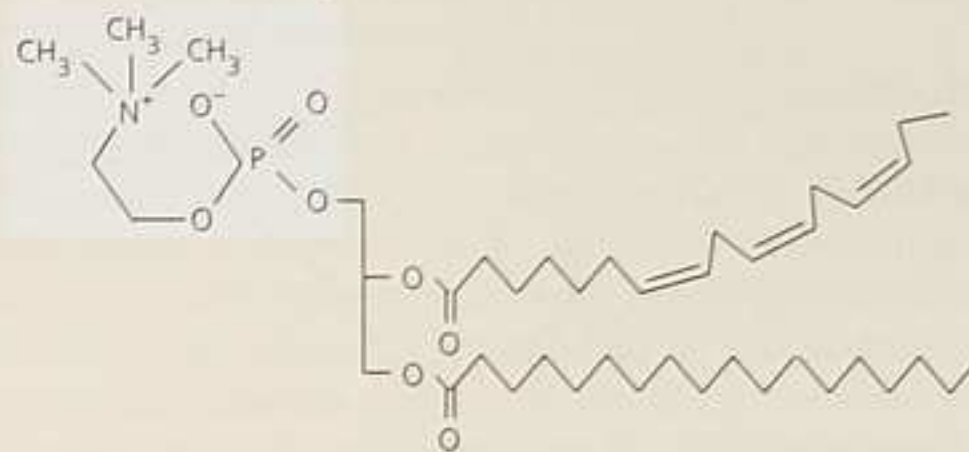
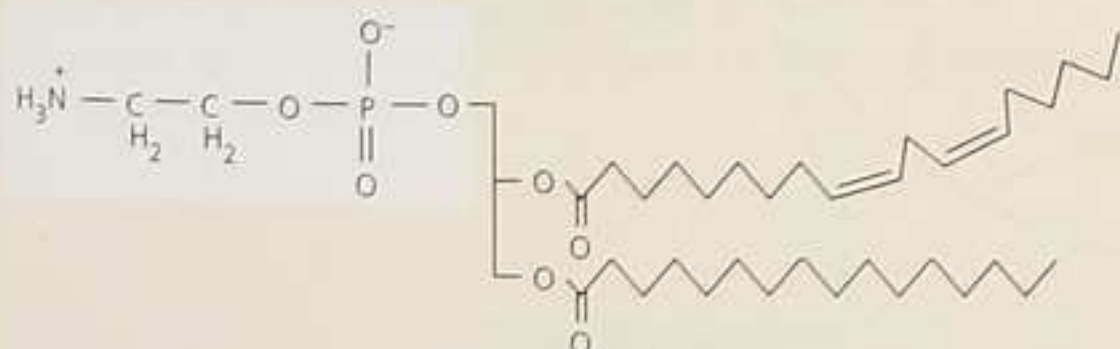
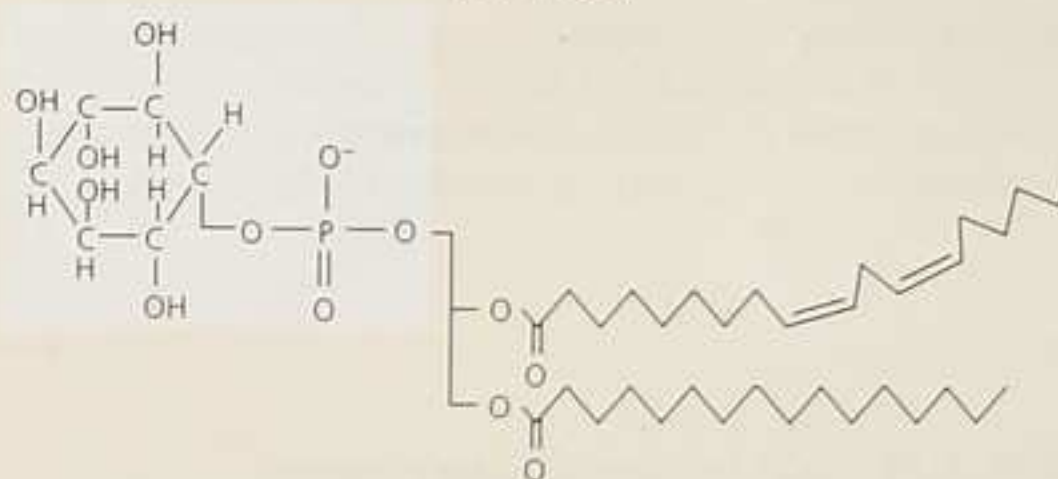
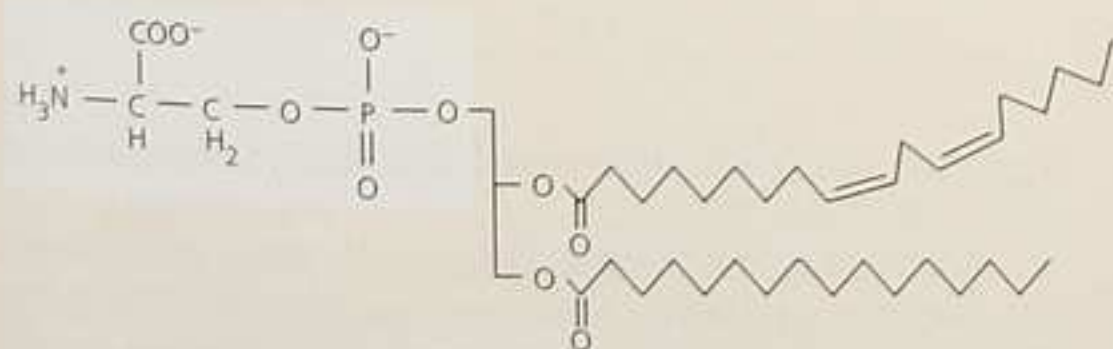
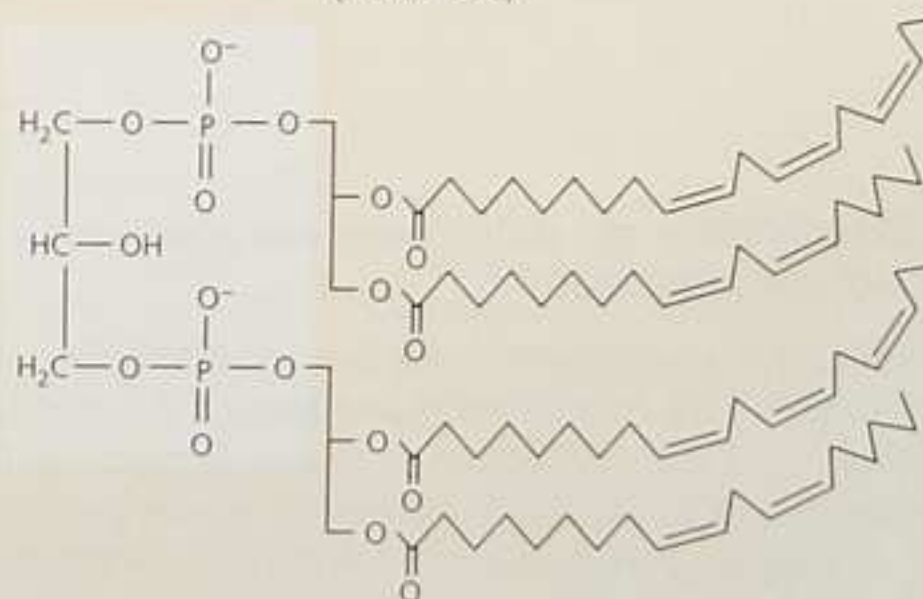
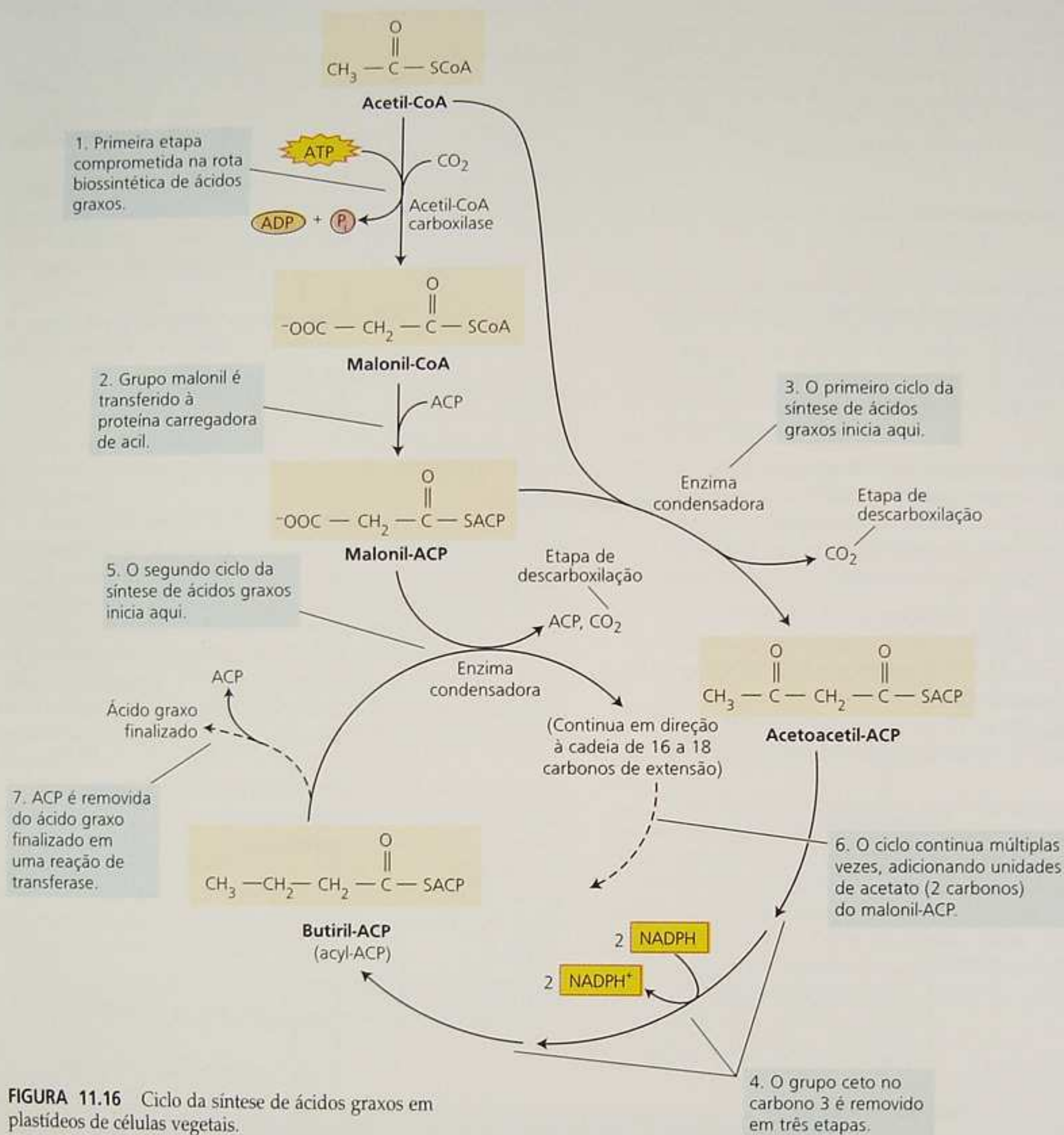



FIGURA 11.16 Ciclo da síntese de ácidos graxos em plastídeos de células vegetais.

Os glicerolipídeos são sintetizados nos plastídeos e no retículo endoplasmático

Os ácidos graxos sintetizados nos plastídeos são em seguida utilizados para compor os glicerolipídeos das membranas e oleossomos. As primeiras etapas na síntese de glicerolipídeos são duas reações de acilação que transferem ácidos graxos da acil-ACP ou acil-CoA para o glicerol-3-fosfato para formar **ácido fosfatídico.**

A ação de uma fosfatase específica produz **diacilglicerol (DAG)** a partir do ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico também pode ser convertido diretamente em fosfatidilinositol ou fosfatidilglicerol; DAG pode originar fosfatidiletanolamina ou fosfatidilcolina (ver Figura 11.17).

A localização das enzimas de síntese de glicerolipídeos revela uma interação complexa e altamente regulada entre o cloroplasto, onde os ácidos graxos são sintetizados, e outros sistemas de membranas da célula. Em termos simples, a bioquímica envolve duas rotas, conhecidas como rota *procariótica* (ou de cloroplasto) e *eucariótica* (ou de retículo endoplasmático).

1. Em cloroplastos, a **rota procariótica** utiliza os produtos 16:0 e 18:1-ACP da síntese de ácidos graxos no cloroplasto para sintetizar ácido fosfatídico e seus derivados. Alternativamente,

os ácidos graxos podem ser exportados ao citoplasma como CoA ésteres.

2. No citoplasma, a **rota eucariótica** utiliza um conjunto separado de aciltransferases no retículo endoplasmático, para incorporar os ácidos graxos em ácido fosfatídico e seus derivados.

Uma versão simplificada deste modelo está representada na Figura 11.17.

Em algumas plantas superiores, incluindo *Arabidopsis* e espinafre, as duas rotas contribuem quase igualmente para a síntese de lipídeos dos cloroplastos. Em muitas outras angiospermas, no entanto, fosfatidilglicerol é o único produto da rota procariótica, enquanto os demais lipídeos do cloroplasto são sintetizados inteiramente pela rota eucariótica.

A bioquímica da síntese de triacilglicerol em sementes oleaginosas é geralmente a mesma descrita para glicerolipídeos. 16:0 e 18:1-ACP são sintetizados nos plastídeos da célula e exportados como CoA tioésteres, para incorporação no DAG no retículo endoplasmático (ver Figura 11.17).

As enzimas-chave no metabolismo de sementes oleaginosas (não-mostradas na Figura 11.17) são acil-CoA:DAG aciltransferase e PC:DAG aciltransferase, que catalisam a síntese de triacilglicerol (Dahlqvist e cols., 2000). Conforme observado anteriormente, moléculas de triacilglicerol acumulam-se em estruturas subcelulares especializadas — os oleossomos — a partir das quais elas podem ser mobilizadas durante a germinação e convertidas em açúcar.

A composição lipídica influencia a função da membrana

Uma questão central na biologia de membranas é a razão funcional subjacente à diversidade de lipídeos. Cada sistema de membranas da célula tem um complemento característico e distinto de tipos de lipídeos, e, dentro de uma única membrana, cada classe de lipídeos tem uma composição distinta de ácidos graxos. Nosso entendimento de membrana é aquele no qual os lipídeos compõem a bicamada semipermeável e fluida, que é a matriz para as proteínas funcionais da membrana.

Uma vez que esta função genérica dos lipídeos poderia ser preenchida por uma única espécie insaturada de fosfatidilcolina, obviamente tal modelo simples é insatisfatório. Por que é necessária a diversidade de lipídeos? Um aspecto da biologia de membranas que pode responder a esta questão central é a relação entre a composição lipídica e a capacidade dos organismos de se ajustarem a mudanças de temperatura (Wolter e cols., 1992). Por exemplo, plantas sensíveis ao frio experimentam reduções bruscas na taxa de crescimento e no desenvolvimento a temperaturas entre 0 e 12 °C (ver Capítulo 25). Muitas culturas economicamente importantes, como algodão, soja, milho, arroz e inúmeras frutíferas tropicais e subtropicais são classificadas como sensíveis ao frio. Por outro lado, a maioria das plantas que se originam de regiões temperadas é capaz de crescer e se desenvolver em temperaturas baixas e são classificadas como resistentes ao frio.

Tem sido sugerido que, devido ao decréscimo na fluidez lipídica a baixas temperaturas, o evento primário de dano por resfriamento é uma transição de uma fase líquido-cristalina para uma fase de gel nas membranas celulares. De acordo com esta proposta, tal transição resultaria em alterações no metabolismo de células resfriadas e levaria ao dano e à morte das plantas sensíveis ao frio. O grau de insaturação dos ácidos graxos determinaria a temperatura na qual o dano ocorreria.

Pesquisas recentes, no entanto, sugerem que a relação entre a insaturação das membranas e as respostas dos vegetais a baixas temperaturas é mais sutil e complexa (ver **Tópico 11.8 na Internet**). As respostas de mutantes de *Arabidopsis* com saturação aumentada dos ácidos graxos a baixas temperaturas parecem distintas do previsto pela hipótese de sensibilidade ao frio, sugerindo que danos normais causadas pelo frio podem não ser estritamente relacionados ao nível de insaturação dos lipídeos das membranas.

Por ouro lado, experimentos com plantas transgênicas de tabaco, sensíveis ao frio, mostram resultados opostos. A expressão transgênica de genes exógenos em tabaco tem sido usada especificamente para diminuir o nível de fosfatidilglicerol saturado ou para causar um aumento geral na insaturação da membrana. Em cada caso, o dano causado pelo resfriamento foi aliviado em certo grau.

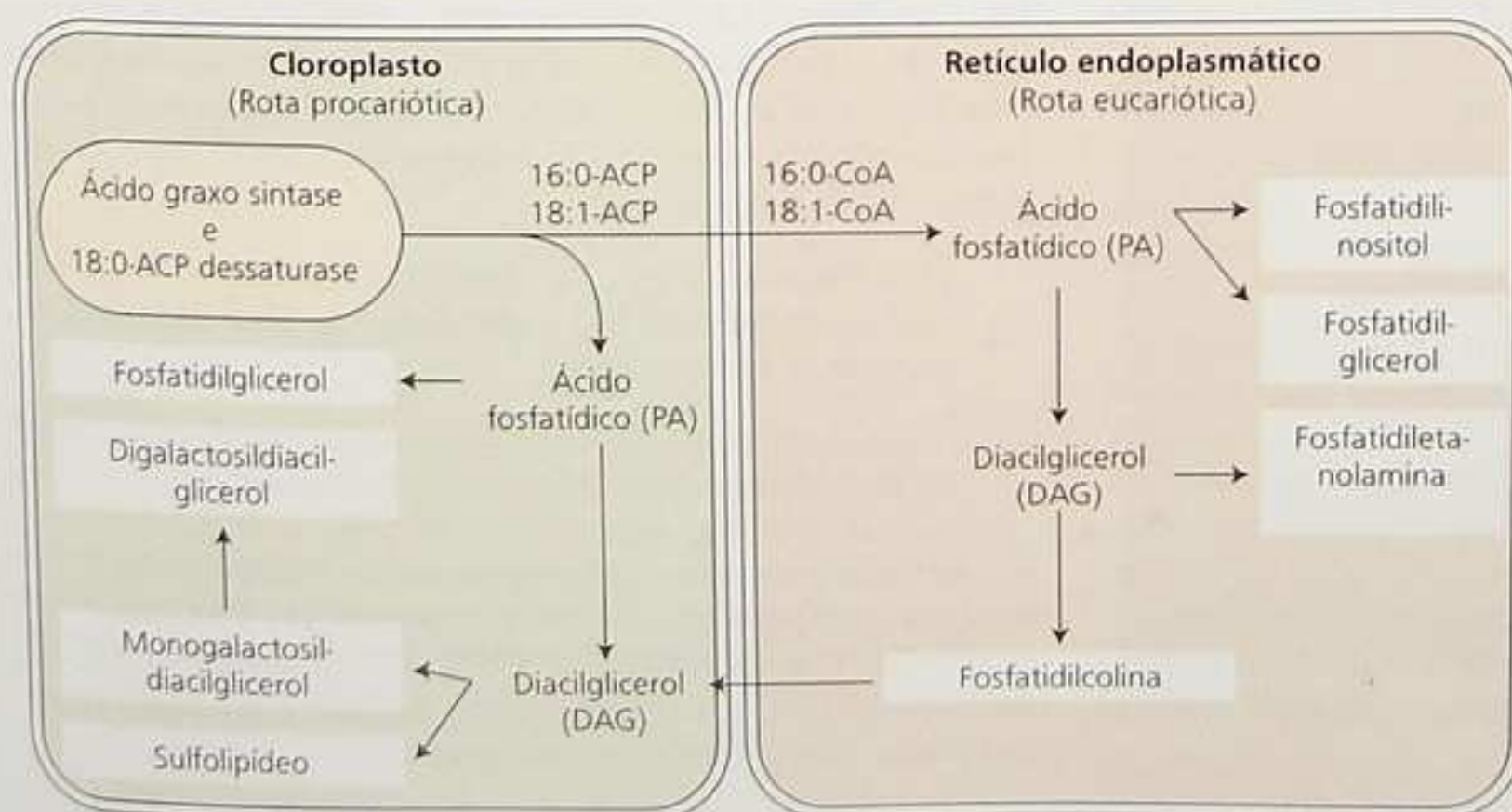



FIGURA 11.17 As duas rotas de síntese de glicerolipídeos no cloroplasto e no retículo endoplasmático de células foliares de *Arabidopsis*. Os principais componentes de membrana são mostrados nas caixas de texto. O glicerolipídeos perdem a saturação no cloroplasto e as enzimas no retículo endoplasmático convertem os ácidos graxos 16:0 e 18:1 nos ácidos graxos mais altamente insaturados mostrados na Figura 11.15.

Estas novas descobertas deixam claro que a extensão da insaturação das membranas ou a presença de lipídeos específicos, como o fosfatidilglicerol dissaturado, podem afetar as respostas das plantas a baixas temperaturas. Conforme discutido no **Tópico 11.8 na Internet**, mais estudos são requeridos para entender completamente a relação entre composição lipídica e função das membranas.

Os lipídeos de membranas são importantes precursores de compostos sinalizadores

Plantas, animais e micróbios utilizam os lipídeos de membrana como precursores de compostos utilizados para sinalização intracelular ou de longo alcance. Por exemplo, o jasmonato derivado do ácido linoléico (18:3) ativa as defesas vegetais contra insetos e muitos fungos patogênicos. Além disso, o jasmonato regula muitos outros aspectos do crescimento vegetal, incluindo o desenvolvimento de anteras e pólens (Stintzi e Browse, 2000). O **fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP_2)** é o mais importante dos vários derivados fosfatados do fosfatidilinositol, conhecidos como *fosfoinositídeos*. Em animais, a ativação mediada por receptores da fosfolipase C leva à hidrólise do PIP_2 a inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol, sendo que ambos agem como mensageiros secundários intracelulares.

A ação do IP_3 em liberar Ca^{2+} no citoplasma (pelos canais sensíveis ao cálcio no tonoplasto e em outras membranas) e, portanto, de regular processos celulares tem sido demonstrada em vários sistemas vegetais, incluindo as células-guarda (Schroeder e cols., 2001). Informações a respeito de outros tipos de sinalização por lipídeos em plantas estão se tornando disponíveis por intermédio de estudos bioquímicos e de genética molecular das fosfolipases (Wang 2001) e de outras enzimas envolvidas na geração destes sinais.

Lipídeos de reserva são convertidos a carboidratos em sementes em germinação

Depois de germinarem, as sementes oleaginosas metabolizam os triacilgliceróis armazenados, convertendo os lipídeos em sacarose. As plantas não são capazes de transportar gorduras do endosperma para os tecidos radiculares e de órgãos aéreos da plântula em germinação, de modo que elas precisam converter os lipídeos armazenados em uma forma mais móvel de carbono, geralmente sacarose, processo que envolve diversas etapas, as quais estão localizadas em diferentes compartimentos celulares: oleossomos, glioxissomos, mitocôndrias e citosol.

Visão geral: lipídeos a sacarose. A conversão de lipídeos em sacarose em sementes oleaginosas é desencadeada pela germinação, começando com a hidrólise dos triacilgliceróis armazenados nos corpos lipídicos para liberar os ácidos graxos, seguida da oxidação dos ácidos graxos para produzir acetil-CoA (Figura 11.18). Os ácidos graxos são oxidados em um tipo de peroxissomo denominado **glioxissomo,** uma organela delimitada por uma única bicamada de membrana, que é encontrada nos tecidos de armazenagem da semente ricos em óleos. A acetil-CoA é metabolizada no glioxissomo (ver Figura 11.18SA) para produzir sucinato, o qual é transportado do glioxissomo para a mitocôndria, onde é convertido primeiro a oxaloacetato e então a malato. O processo termina no citosol, com a conversão do malato a glicose via gliconeogênese e, então, a sacarose.

Embora alguns desses carbonos derivados dos ácidos graxos sejam desviados para outras reações metabólicas em algumas sementes oleaginosas, na mamona (*Ricinus communis*) o processo é tão eficiente que cada grama de lipídeo metabolizado resulta na formação de 1 g de carboidrato, o que é equivalente a 40% de recuperação da energia livre na forma de ligações de carbono ([15,9 kJ/ 40 kJ] × 100 = 40%).

Hidrólise das lipases. A etapa inicial na conversão de lipídeos a carboidratos é a quebra dos triglicerídeos armazenados nos corpos lipídicos pela enzima lipase, que, pelo menos no endosperma da mamona, está localizada na meia membrana que serve como barreira externa do corpo lipídico. A lipase hidrolisa triacilgliceróis a três moléculas de ácidos graxos e glicerol. Milho e algodão também contêm uma atividade de lipase no corpo lipídico, mas amendoim, soja e pepino, ao contrário, mostram atividade de lipase no glioxissomo. Durante a degradação dos lipídeos, os corpos lipídicos e glioxissomos estão geralmente em associação física íntima (ver Figura 11.18B).

β-oxidação de ácidos graxos. Após a hidrólise dos triacilgliceróis, os ácidos graxos resultantes entram no glioxissomo, onde são ativados pela conversão em graxo-acil-CoA pela enzima graxo-acil-CoA sintase. Graxo-acil-CoA é o substrato inicial para a série de reações de β-oxidação, nas quais ácidos graxos C_n (ácidos graxos compostos de um número n de carbonos) são seqüencialmente quebrados a $n/2$ moléculas de acetil-CoA (ver Figura11.18A). Esta seqüência de reações envolve a redução de ½ O_2 a H_2O e a formação de 1 NADH e 1 $FADH_2$ para cada acetil-CoA produzido.

Em tecidos de mamíferos, as quatro enzimas associadas à β-oxidação estão presentes na mitocôndria; em tecidos de reserva de sementes vegetais, elas estão localizadas exclusivamente nos glioxissomos. De maneira curiosa, em tecidos vegetais vegetativos (p. ex., hipocótilo de *Vigna radiata* e tubérculo de batata), as reações de β-oxidação estão localizadas em uma organela relacionada, o peroxissomo (ver Capítulo 1).

O ciclo do glioxilato. A função do ciclo do glioxilato é converter duas moléculas de acetil-CoA a sucinato. A acetil-CoA produzida por β-oxidações é posteriormente metabolizada no glioxissomo, por meio de uma série de reações que compõem o ciclo do glioxilato (ver Figura 11.18A). Inicialmente, a acetil-CoA reage com oxaloacetato, gerando citrato, que é, então, transferido ao citoplasma para isomerização a isocitrato. O isocitrato é reimportado para o peroxissomo e convertido a malato por duas reações que são singulares à rota do glioxilato.

1. Primeiro, isocitrato (C_6) é clivado pela enzima isocitrato liase para gerar sucinato (C_4) e glioxilato (C_2). Este sucinato é exportado às mitocôndrias.
2. A seguir, a malato sintase combina uma segunda molécula de acetil-CoA com glioxilato para produzir malato.

O malato é, então, oxidado pela malato desidrogenase a oxaloacetato, que pode se combinar com outra acetil-CoA para continuar o ciclo (ver Figura 11.18A). O glioxilato produzido mantém o ciclo operando no glioxissomo, mas o sucinato é exportado às mitocôndrias para posterior processamento.

(A)

Ácidos graxos são metabolizados por β-oxidação a acetil-CoA no glioxissomo.

Lipase

OLEOSSOMO

Triacilgliceróis

Triacilgliceróis são hidrolisados para produzir ácidos graxos.

Ácido graxo

Ácido-graxo-CoA sintase

CoA

Acil-CoA (C_n)

Acetil-CoA

β-oxidação

$\frac{n}{2} O_2$

nH_2O

n NAD^+

n NADH

n FAD

n $FADH_2$

CoA

Citrato

Citrato sintase

Oxaloacetato

Glyoxylate cycle

NADH

NAD^+

Malato desidrogenase

Malato

Malato sintase

CoA

Glioxilato

CHO | COOH

Isocitrato

Isocitrato liase

Sucinato

Citrato

Aconitase

Isocitrato

Cada duas moléculas de acetil-CoA produzidas são metabolizadas pelo ciclo do glioxilato para gerar um sucinato.

CITOSOL

GLIOXISSOMO

Fosfoenolpiruvato

Frutose-6-P

Sacarose

CO_2

ADP

PEP carboxicinase

ATP

Oxaloacetato

Malato desidrogenase

NADH

NAD^+

Malato

Sucinato

Fumarato

Malato

MITOCÔNDRIA

O sucinato move-se para dentro da mitocôndria e é convertido a malato.

O malato é transportado para o citosol e oxidado a oxaloacetato, o qual é convertido a fosfoenolpiruvato pela enzima carboxiquinase. O PEP resultante é, então, metabolizado para produzir sacarose pela rota gliconeogênica.

(B)

Glioxissomo

Mitocôndria

Oleossomo

FIGURA 11.18 Conversão de gorduras em açúcares durante a germinação de sementes oleaginosas. (A) Fluxo de carbono durante a degradação de ácidos graxos e gliconeogênese (conferir estruturas nas Figuras 11.2, 11.3 e 11.6). (B) Electromicrografia de uma célula do cotilédone armazenador de óleos de uma plântula de pepino, mostrando glioxissomos, mitocôndrias e oleossomos (foto cedida por R. N. Trelease).

O papel mitocondrial. Ao mover-se dos glioxissomos para as mitocôndrias, o sucinato é convertido a malato pelas reações normais do ciclo do ácido cítrico. O malato resultante pode ser exportado das mitocôndrias em troca pelo sucinato, por meio do transportador de dicarboxilatos localizados na membrana mitocondrial interna. O malato é, então, oxidado a oxaloacetato pela malato desidrogenase no citosol, enquanto o oxaloacetato resultante é convertido a carboidrato.

Essa conversão exige contornar a irreversibilidade da reação da piruvato quinase (ver Figura 11.3) e é facilitada pela enzima PEP carboxiquinase, que utiliza a capacidade de fosforilação do ATP para converter oxaloacetato a PEP e CO_2 (ver Figura 1.18A). A partir do PEP, a gliconeogênese pode prosseguir com a produção de glicose, conforme já descrito. A sacarose é o produto final deste processo e a forma primária de carbono reduzido translocado dos cotilédones aos tecidos em crescimento das plântulas. Nem todas as sementes convertem gordura em açúcar quantitativamente (ver **Tópico 11.9 na Internet**).

RESUMO

Na respiração vegetal, o carbono celular reduzido gerado durante a fotossíntese é oxidado a CO_2 e água, oxidação esta acoplada à síntese de ATP. A respiração ocorre em três estádios principais: a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa. Esta última compreende a cadeia de transporte de elétrons e a síntese de ATP.

Na glicólise, o carboidrato é convertido a piruvato no citosol, sendo uma pequena quantidade de ATP sintetizada via fosforilação no substrato. O piruvato é subseqüentemente oxidado dentro da matriz mitocondrial, por meio do ciclo do ácido cítrico, gerando um grande número de equivalentes redutores na forma de NADH e $FADH_2$.

No terceiro estádio, a fosforilação oxidativa, os elétrons do NADH e $FADH_2$ passam pela cadeia de transporte de elétrons, na membrana mitocondrial interna, para reduzir o oxigênio. A energia química é conservada na forma de um gradiente eletroquímico de prótons, que é criado pelo acoplamento do fluxo de elétrons ao bombeamento de prótons da matriz ao espaço intermembrana. Esta energia é, então, convertida em energia química na forma de ATP pela F_oF_1-sintase, também localizada na membrana interna, que acopla a síntese de ATP, a partir de ADP e P_i, ao fluxo de prótons de volta para a matriz, ao longo de seu gradiente eletroquímico.

A respiração aeróbica em plantas tem várias características singulares, incluindo a presença de uma oxidase alternativa resistente ao cianeto e múltiplas NAD(P)H desidrogenases, mas nenhuma delas bombeia prótons. A oxidação de substratos durante a respiração é regulada em pontos de controle na glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia de transporte de elétrons, mas, em última análise, a oxidação dos substratos é controlada pelo nível celular de ADP. Os carboidratos também podem ser oxidados na rota das pentoses fosfato, nas quais a força redutora é produzida na forma de NADPH, principalmente para fins biossintéticos. Inúmeros intermediários da glicólise e do ciclo do ácido cítrico também proporcionam o ponto de partida para múltiplas rotas biossintéticas.

Mais de 50% da produtividade fotossintética diária pode ser respirada por uma planta, mas muitos fatores podem afetar a taxa respiratória observada na planta inteira. Tais fatores incluem a natureza e a idade do tecido vegetal, assim como fatores ambientais, como a luz, a concentração de oxigênio, a temperatura e a concentração de CO_2.

Os lipídeos desempenham um papel importante nas plantas: lipídeos anfipáticos atuam como os componentes não-protéicos primários das membranas vegetais; gorduras e óleos são uma eficiente forma de armazenagem de carbono reduzido, particularmente em sementes. Os glicerolipídeos desempenham importantes papéis como componentes estruturais de membranas. Os ácidos graxos são sintetizados nos plastídeos, utilizando acetil-CoA. Os ácidos graxos dos plastídeos podem ser transportados ao retículo endoplasmático, onde são posteriormente modificados.

A função das membranas pode ser influenciada pela composição de lipídeos. O grau de insaturação dos ácidos graxos influencia a sensibilidade das plantas ao frio, mas não parece estar envolvido nos danos normais causados pelo resfriamento. Por outro lado, certos produtos de membrana resultantes da degradação de lipídeos, como ácido jasmônico, podem atuar como agentes sinalizadores em células vegetais.

O triacilglicerol é sintetizado no retículo endoplasmático e acumula-se dentro da bicamada de fosfolipídeos, formando corpos lipídicos. Durante a germinação de sementes oleaginosas, os lipídeos armazenados são metabolizados a carboidratos em uma série de reações que envolvem uma seqüência metabólica conhecida como o ciclo do glioxilato, o qual ocorre nos glioxissomos e etapas subseqüentes ocorrem nas mitocôndrias. O carbono reduzido gerado durante a quebra dos lipídeos nos glioxissomos é, por fim, convertido a carboidrato no citosol por gliconeogênese.

Material da Internet

Tópicos da Internet

11.1 Isolamento de mitocôndrias
Métodos para o isolamento de mitocôndrias intactas e funcionais foram desenvolvidos.

11.2 A cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias vegetais contém múltiplas NAD(P)H desidrogenases
As NAD(P)H desidrogenases mitocondriais oxidam NADH ou NADPH e passam os elétrons à ubiquinona.

11.3 A oxidase alternativa
A oxidase alternativa é uma oxirredutase localizada na membrana interna das mitocôndrias vegetais.

11.4 F0F1-ATP sintases: os menores motores giratórios do mundo
A rotação da subunidade γ gera as mudanças de conformação que permitem a liberação de ATP da enzima.

11.5 Transporte para dentro e fora das mitocôndrias vegetais
As mitocôndrias vegetais operam diferentes mecanismos de transporte.

11.6 O sistema genético das mitocôndrias vegetais tem algumas características especiais
O genoma mitocondrial codifica cerca de 40 proteínas mitocondriais.

11.7 A respiração reduz a produtividade das culturas?
Relações empíricas entre as taxas de respiração vegetal e a produtividade de culturas foram estabelecidas.

11.8 A composição lipídica das membranas afeta a biologia celular e a fisiologia das plantas
Mutantes lipídicos estão expandindo o nosso conhecimento acerca da capacidade dos organismos de se adaptarem às mudanças de temperatura.

11.9 A utilização de reservas de óleo dos cotilédones
Em algumas espécies, apenas parte dos lipídeos armazenados nos cotilédones é exportada como carboidrato.

Ensaios da Internet

11.1 A flexibilidade metabólica ajuda as plantas a sobreviverem ao estresse
A capacidade das plantas de realizarem uma etapa metabólica de diferentes formas aumenta a sobrevivência vegetal sob estresse.

11.2 A elaboração do perfil metabólico das células vegetais
A elaboração do perfil metabólico complementa a genômica e a proteômica.

11.3 Regulação térmica por flores termogênicas
Em flores termogênicas, como em certas aráceas, a temperatura pode aumentar em até 20 °C acima do ambiente externo.

11.4 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e mitocôndrias vegetais
A produção de espécies reativas danosas de oxigênio é uma conseqüência inevitável da respiração aeróbica.

11.5 O papel da respiração na tolerância à dessecação
A respiração tem efeitos tanto positivos quanto negativos na sobrevivência de células vegetais sob estresse hídrico.

11.6 O balanço entre vida e morte; o papel das mitocôndrias na morte celular programada
A morte celular programada é parte integral do ciclo de vida das plantas, envolvendo diretamente as mitocôndrias.

Referências bibliográficas

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621-628.

Ap Rees, T. (1980) Assessment of the contributions of metabolic pathways to plant respiration. In *The Biochemistry of Plants, Vol. 2*, D. D. Davies, ed., Academic Press, New York, pp. 1-29.

Brand, M. D. (1994) The stoichiometry of proton pumping and ATP synthesis in mitochondria. *Biochemist* 16(4):20-24.

Bruhn, D., Mikkelsen, T. N., and Atkin, O. K. (2002) Does the direct effect of atmospheric CO_2 concentration on leaf respiration vary with temperature? Responses in two species of *Plantago* that differ in relative growth rate. *Physiol. Plant.* 114: 57-64.

Budde, R. J. A., and Randall, D. D. (1990) Pea leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex is inactivated *in* vivo in a light-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:673-676.

Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., and Stymne, S. (2000) Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6487-6492.

Dennis, D. T., and Blakely, S. D. (2000) Carbohydrate metabolism. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W Gruissem, and R. Jones, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 630-674.

Dennis, D. T, Huang, Y, and Negm, F. B. (1997) Glycolysis, the pentose phosphate pathway and anaerobic respiration. In *Plant Metabolism*, 2nd ed., D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, and D. B. Layzell, eds., Longman, Singapore, pp. 105-123.

Douce, R. (1985) *Mitochondria in Higher Plants: Structure, Function, and Biogenesis*. Academic Press, Orlando, FL.

Drake, B. G., Azcon-Bieto, J., Berry, J., Bunce, J., Dijkstra, P, Farrar, J., Gifford, R. M., Gonzalez-Meler, M. A., Koch, G., Lambers, H., Siedow, J., and Wullschleger, S. (1999) Does elevated atmospheric CO_2 concentration inhibit mitochondrial respiration in green plants? *Plant Cell Environ.* 22: 649-657.

Givan, C. V (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: Two centuries of progress. *Biol. Rev.* 74: 277-309.

Griffin, K. L., Anderson, O. R., Gastrich, M. D., Lewis, J. D., Lin, G., Schuster, W., Seemann, J. R., Tissue, D. T., Turnbull, M. H., and Whitehead, D. (2001) Plant growth in elevated CO_2 alters mitochondrial number and chloroplast fine structure. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 98:2473-2478.

Gunning, B. E. S., and Steer, M. W. (1996) *Plant Cell Biology: Structure and Function of Plant Cells*. Jones and Bartlett, Boston.

Hoefnagel, M. H. N., Atkin, O. K., and Wiskich, J. T. (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta* 1366: 235-255.

Huang, J., Struck, F., Matzinger, D. F., and Levings, C. S. (1994) Flower-enhanced expression of a nuclear-encoded mitochondrial respiratory protein is associated with changes in mitochondrion number. *Plant Cell* 6: 439-448.

Jahnke, S. (2001) Atmospheric CO, concentration does not directly affect leaf respiration in bean or poplar. *Plant Cell Environ.* 24: 1139-1151.

Krömer, S. (1995) Respiration during photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 45-70.

Kruger, N. J. (1997) Carbohydrate synthesis and degradation. In *Plant Metabolism*, 2nd ed., D. T. Dennis, D. H. Turpin, D. D. Lefebvre, and D. B. Layzell, eds., Longman, Singapore, pp. 83-104.

Laloi, M., Klein, M., Riesmeier, J. W., Müller-Rober, B., Fleury, C., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (1997) A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature* 389: 135-136.

Lambers, H. (1985) Respiration in intact plants and tissues. Its regulation and dependence on environmental factors, metabolism and invaded organisms. In *Higher Plant Cell Respiration* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 18), R. Douce and D. A. Day, eds., Springer, Berlin, pp. 418-173.

Leon, P., Arroyo, A., and Mackenzie, S. (1998) Nuclear control of plastid and mitochondrial development in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 453-480.

Levings, C. S., III, and Siedow, J. N. (1992) Molecular basis of disease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize. *Plant Mol. Biol.* 19: 13,5-147.

Marienfeld, J., Unseld, M., and Brennicke, A. (1999) The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci.* 4:495-502.

McCabe, T. C., Daley, D., and Whelan, J. (2000) Regulatory, developmental and tissue aspects of mitochondrial biogenesis in plants. *Plant Biol.* 2:121-135.

Moller, 1. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591.

Moller, 1. M., and Rasmusson, A. G. (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci.* 3: 21-27.

Napier, J. A., Stobart, A. K., and Shewry, P R. (1996) The structure and biogenesis of plant oil bodies: The role of the ER membrane and the oleosin class of proteins. *Plant Mol. Biol.* 31: 94,5-956.

Nicholls, D. G., and Ferguson, S. J. (2002) *Bioenergetics 3*, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Noctor, G., and Foyer, C. H. (1998) A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C3 photosynthesis: A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J. Exp. Bot.* 49: 1895-1908.

Ohlrogge, J. B., and Browse, J. A. (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* 7:957-970.

Ohlrogge, J. B., and Jaworski, J. G. (1997) Regulation of fatty acid synthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 109-136.

Capítulo

12 Assimilação de nutrientes minerais

AS PLANTAS SUPERIORES SÃO ORGANISMOS AUTOTRÓFICOS que podem sintetizar seus componentes orgânicos a partir de nutrientes inorgânicos obtidos do ambiente. Para muitos nutrientes minerais, o processo envolve a absorção de compostos do solo pelas raízes (ver Capítulo 5) e a incorporação em compostos orgânicos, essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento. Essa incorporação dos nutrientes minerais em substâncias orgânicas como os pigmentos, os co-fatores enzimáticos, os lipídeos, os ácidos nucléicos e os aminoácidos, é denominada **assimilação de nutrientes.**

A assimilação de alguns nutrientes — em particular nitrogênio e enxofre — requer uma série complexa de reações bioquímicas, que estão entre as reações de maior demanda energética dos organismos vivos:

- Na assimilação do nitrato (NO_3^-), o nitrogênio do NO_3^- é convertido em uma forma mais energética, o nitrito (NO_2^-) e, então, em uma forma ainda mais energética, o amônio (NH_4^+), e finalmente em nitrogênio-amida da glutamina. Este processo consome o equivalente a 12 ATPs para cada nitrogênio (Bloom e cols., 1992).
- Plantas como as leguminosas, por exemplo, estabelecem uma relação simbionte com bactérias fixadoras de nitrogênio, para converter o nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3), que é o primeiro produto estável no processo natural de fixação; entretanto, em pH fisiológico, a amônia é protonada para formar o íon amônio (NH_4^+). O processo de fixação biológica do nitrogênio, junto com a subseqüente assimilação de NH_3 em um aminoácido, consome cerca de 16 ATPs por nitrogênio (Pate e Layzell, 1990; Vande Broek e Vanderleyden, 1995).
- A assimilação de sulfato (SO_4^{2-}) no aminoácido cisteína, por meio de duas rotas encontradas nas plantas, consome cerca de 14 ATPs (Hell, 1997).

Para ter-se uma idéia da enorme quantidade de energia envolvida, deve-se considerar que, se essas reações ocorressem rapidamente em reverso — por exemplo, de NH_4NO_3 (nitrato de amônio) para N_2 — elas se tornariam explosivas, liberando grandes quantidades de energia como movimento, calor e luz. Praticamente todos os explosivos são baseados na rápida oxidação de compostos de nitrogênio ou de enxofre.

A assimilação de outros nutrientes, especialmente os macro e os micronutrientes catiônicos (ver Capítulo 5), envolve a formação de complexos com compostos orgânicos. Por exemplo, o Mg^{2+} associa-se ao pigmento clorofila, o Ca^{2+} associa-se a pectatos na parede celular e o Mo^{6+} com enzimas como a nitrato redutase e a nitrogenase. Tais complexos são altamente estáveis, sendo que a remoção do nutriente do complexo pode resultar na perda total de função.

Este capítulo resume as reações primárias pelas quais os principais nutrientes (nitrogênio, enxofre, fosfato, cátions e oxigênio) são assimilados. Serão enfatizadas as implicações fisiológicas do gasto energético requerido e introduzido o tópico da fixação simbiótica do nitrogênio.

NITROGÊNIO NO AMBIENTE

Muitos compostos bioquímicos presentes nas células vegetais possuem nitrogênio (ver Capítulo 5). Por exemplo, o nitrogênio é encontrado nos nucleosídeos fosfato e nos aminoácidos que formam a estrutura dos ácidos nucléicos e das proteínas, respectivamente. Apenas elementos como o oxigênio, o carbono e o hidrogênio são mais abundantes nas plantas que o nitrogênio. A maioria dos ecossistemas naturais e agrários apresenta um expressivo ganho na produtividade após serem fertilizados com nitrogênio inorgânico, atestando a importância desse elemento.

Nesta seção, tanto o ciclo biogeoquímico do nitrogênio, o papel crucial da fixação de nitrogênio na conversão do nitrogênio molecular em amônio e em nitrato, quanto o destino do nitrato e do amônio nos tecidos vegetais serão discutidos.

O nitrogênio é transformado em diferentes formas no ciclo biogeoquímico

O nitrogênio está presente em diversas formas na biosfera. A atmosfera contém uma vasta quantidade (cerca de 78% por volume) de nitrogênio molecular (N_2) (ver Capítulo 9). Porém, esse grande reservatório de nitrogênio não está diretamente disponível para os organismos vivos. A obtenção de nitrogênio da atmosfera requer a quebra de uma ligação tripla covalente de excepcional estabilidade, entre os dois átomos de nitrogênio ($N{\equiv}N$) para produzir amônia (NH_3) ou nitrato (NO_3^-). Tais reações, conhecidas como **fixação do nitrogênio**, podem ser obtidas por processo industrial e por processo natural.

Sob elevadas temperaturas (cerca de 200 °C) e alta pressão (cerca de 200 atmosferas), o N_2 combina-se com hidrogênio formando amônia. As condições extremas são necessárias para superar a alta energia de ativação da reação. Essa reação de fixação de nitrogênio, conhecida como *processo Haber-Bosch*, é o ponto de partida para a fabricação de muitos produtos para a indústria e agricultura. Indústrias em todo o mundo produzem mais de 80×10^{12} g ano^{-1} de fertilizantes nitrogenados (FAOSTAT, 2001).

Os processos naturais fixam cerca de 190×10^{12} g ano^{-1} de nitrogênio (Tabela 12.1) por meio dos seguintes processos (Schlesinger, 1997):

TABELA 12.1
Principais processos do ciclo biogeoquímico do nitrogênio

Processo	Definição	Taxa (10^{12} g ano^{-1})[a]
Fixação industrial	Conversão industrial do nitrogênio molecular em amônia	80
Fixação atmosférica	Conversão fotoquímica e pelos relâmpagos do nitrogênio molecular em nitrato	19
Fixação biológica	Conversão do nitrogênio molecular em amônia pelos procariontes	170
Aquisição pelos vegetais	Absorção e assimilação do amônio ou nitrato pelos vegetais	1200
Imobilização	Absorção e assimilação do amônio ou nitrato por microrganismos	N/C
Amonificação	Ação das bactérias e fungos no catabolismo da matéria orgânica do solo em amônio	N/C
Nitrificação	Oxidação bacteriana (*Nitrosomonas* sp.) do amônio em nitrito e a posterior oxidação pelas bactérias (*Nitrobacter* sp.) do nitrito em nitrato	N/C
Mineralização	Ação das bactérias e fungos no catabolismo da matéria orgânica do solo em nitrogênio mineral, por meio da amonificação ou nitrificação	N/C
Volatilização	Perda física do gás amônia para a atmosfera	100
Fixação do amônio	Ligação física do amônio nas partículas do solo	10
Desnitrificação	Conversão bacteriana do nitrato em óxido nitroso e nitrogênio molecular	210
Lixiviação do nitrato	Escoamento físico do nitrato dissolvido no lençol de água das camadas superiores do solo e eventualmente para os oceanos	36

Nota: Organismos terrestres, do solo e dos oceanos contêm cerca de $5{,}2 \times 10^{15}$ g e 95×10^{15} g e $6{,}5 \times 10^{15}$ g, respectivamente, de nitrogênio orgânico que é ativo no ciclo. Admitindo que a quantidade de N_2 na atmosfera permanece constante (entrada = saída), o tempo médio de residência (o tempo médio que a molécula de nitrogênio permanece na forma orgânica) é cerca de 370 anos [(tamanho do *pool*)/(fixação *input*) = $(5{,}2 \times 10^{15}$ g $+ 95 \times 10^{15}$ g$)/(80 \times 10^{12}$ g $ano^{-1} + 19 \times 10^{12}$ g $ano^{-1} + 170 \times 10^{12}$ g $ano^{-1})$] (Schlesinger, 1997). [a] N/C, não-calculado.

- *Relâmpagos*. Os relâmpagos são responsáveis por aproximadamente 8% do nitrogênio fixado. Convertem o vapor de água e oxigênio em radicais hidroxilas livres altamente reativos, em átomos de hidrogênio livre e em átomos de oxigênio livre, que atacam o nitrogênio molecular (N_2) para formar o ácido nítrico (HNO_3). Posteriormente, esse ácido nítrico precipita sobre a Terra junto com a chuva.
- *Reações fotoquímicas*. Cerca de 2% do nitrogênio fixado é derivado de reações fotoquímicas entre o óxido nítrico gasoso (NO) e o ozônio (O_3), produzindo o ácido nítrico (HNO_3).
- *Fixação biológica do nitrogênio*. Noventa por cento (90%) do nitrogênio restante resultam da fixação biológica, nos quais as bactérias ou algas azuis (cianobactérias) fixam o N_2 em amônio (NH_4^+).

Do ponto de vista agrícola, a fixação biológica do nitrogênio é crítica, pois, raramente, a produção industrial de fertilizantes à base de nitrogênio supre a demanda agrícola (FAOSTAT, 2001).

Uma vez fixado em amônio ou nitrato, o nitrogênio entra no ciclo biogeoquímico, passando por várias formas orgânicas ou inorgânicas antes de eventualmente retornar à forma de nitrogênio molecular (Figura 12.1; Tabela 12.1). Os íons amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) gerados pela fixação ou liberados por decomposição da matéria orgânica do solo, tornam-se objetos de intensa competição entre plantas e microrganismos. Para permanecerem competitivos, os vegetais desenvolveram mecanismos para capturar esses íons, a partir da solução do solo, tão rápido quanto possível (ver Capítulo 5). Sob as concentrações elevadas no solo, que ocorrem após a fertilização, a absorção do amônio e do nitrato pelas raízes pode exceder a capacidade de uma planta em assimilar esses íons, levando ao seu acúmulo nos tecidos vegetais.

O amônio ou o nitrato armazenados podem ser tóxicos

As plantas podem acumular altos níveis de nitrato ou podem translocá-lo através dos tecidos sem efeitos prejudiciais. Entretanto, se os animais e os homens consumirem material vegetal com altos níveis de nitrato, eles podem sofrer de metemoglobinemia, uma doença na qual o fígado reduz o nitrato a nitrito, o qual se combina com a hemoglobina, resultando em uma hemoglobina incapaz de se combinar com o oxigênio. O homem e os outros animais são capazes também de converter nitrato em nitrosaminas, as quais são potentes carcinogênicos. Nesse sentido, alguns países impõem limites nos níveis de nitrato nos vegetais que são consumidos pelo homem.

Em comparação com o nitrato, altos níveis de amônio são tóxicos tanto para as plantas quanto para os animais. O amônio é capaz de dissipar os gradientes de prótons transmembrana (Figura 12.2) necessários ao transporte de elétrons na fotossíntese e na

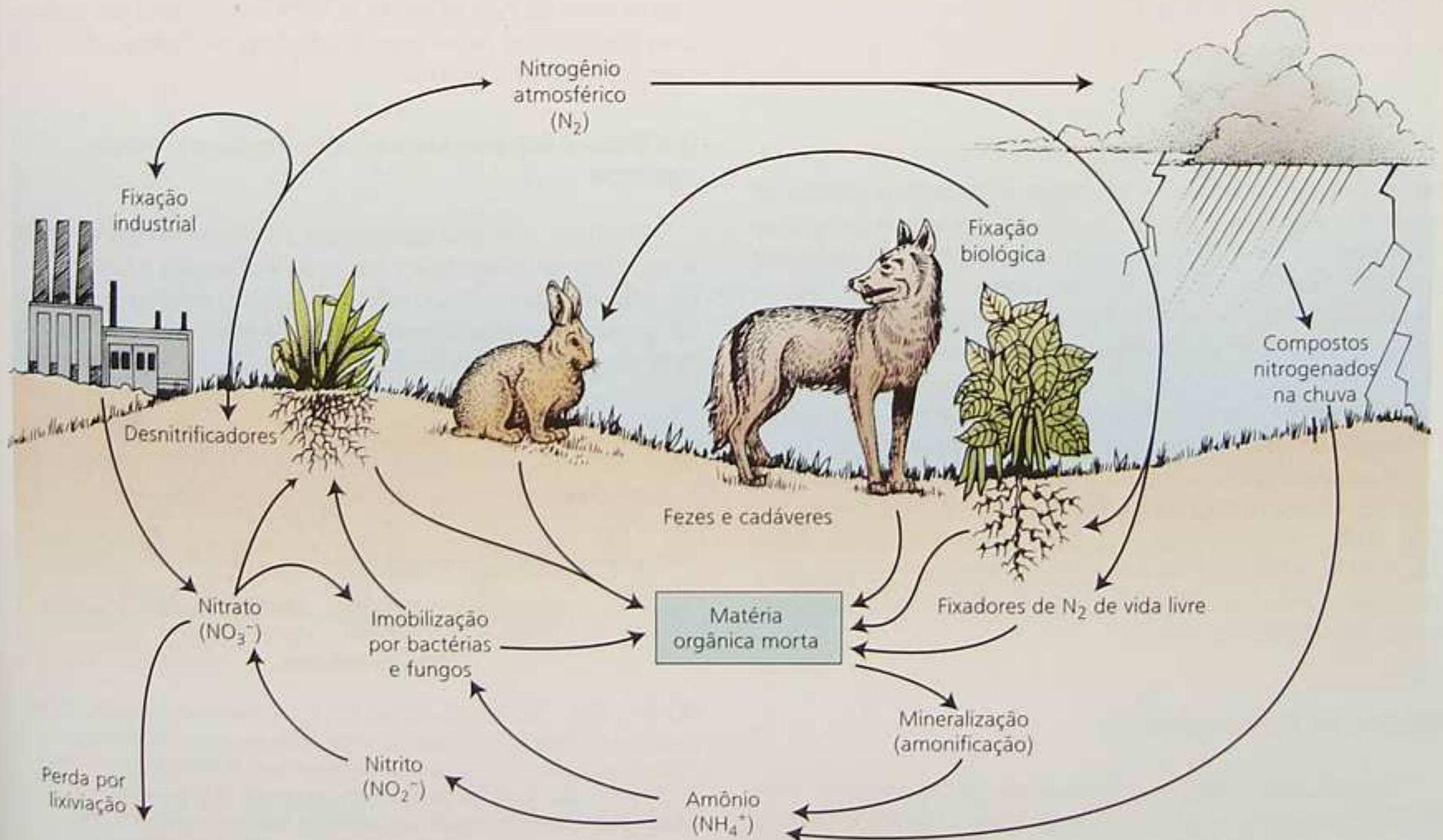



FIGURA 12.1 Ciclo do nitrogênio. O nitrogênio da atmosfera varia desde a forma gasosa à de íons reduzidos, antes de ser incorporado a compostos orgânicos nos organismos vivos. Algumas etapas envolvidas no ciclo do nitrogênio estão representadas.

Em pH alto, o NH_4^+ reage com o OH^- para formar NH_3.

NH_3 é permeável à membrana e se difunde por intermédio dessa, de acordo com o seu gradiente de concentração.

NH_3 reage com o H^+ para formar NH_4^+.

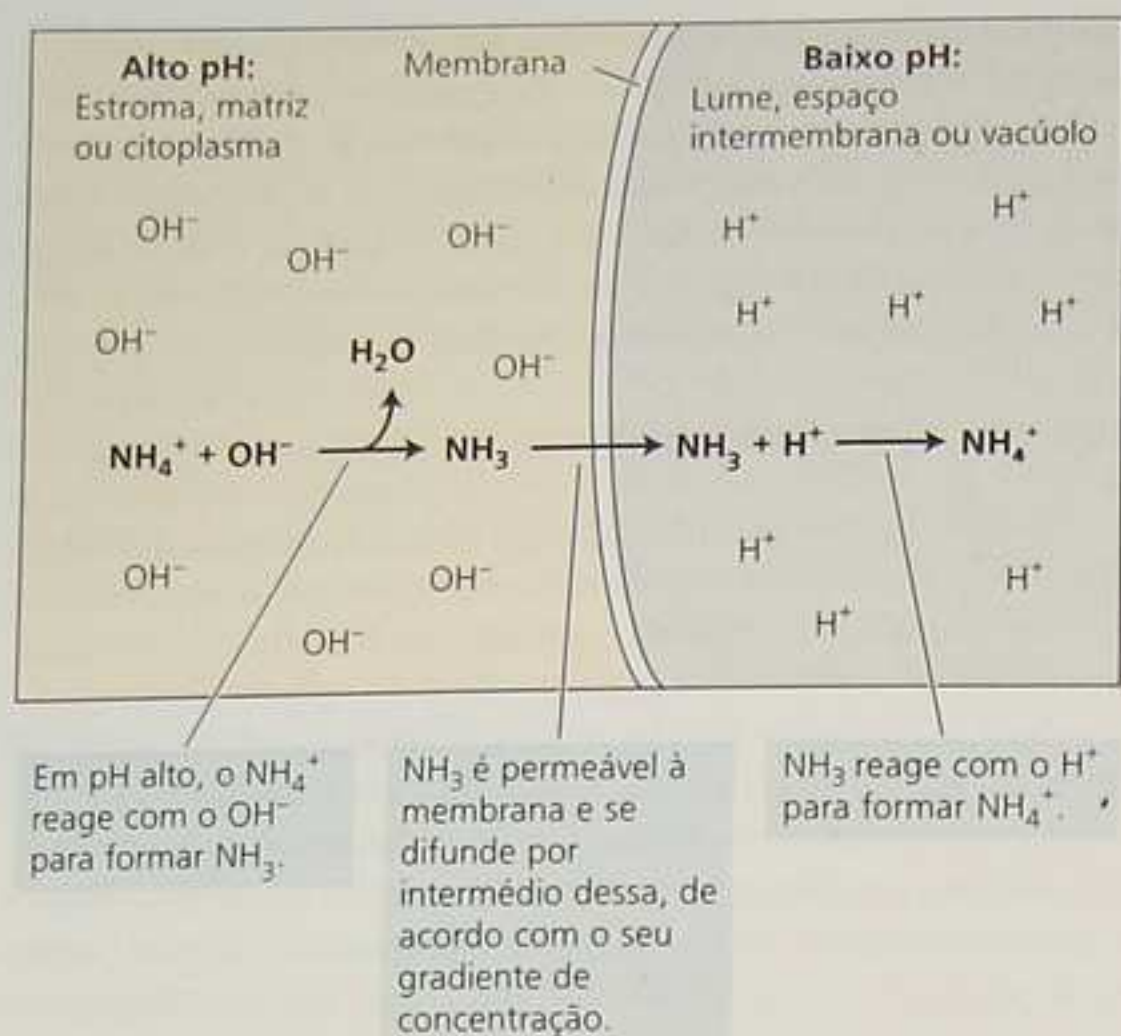



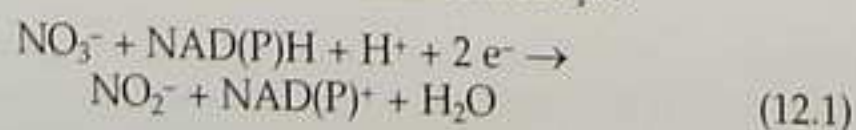
FIGURA 12.2 A toxicidade do NH_4^+ pode dissipar os gradientes de pH. O lado esquerdo representa o estroma, a matriz mitocondrial ou o citoplasma, onde o pH é mais elevado. O lado direito representa o lume, o espaço intermembrana ou o vacúolo, onde o pH é mais baixo; a membrana representa o tilacóide do cloroplasto, a membrana interna mitocondrial ou o tonoplasto do vacúolo de uma célula de raiz. O resultado líquido da reação mostra que as concentrações de OH^- do lado esquerdo e de H^+ do lado direito diminuíram, isto é, o gradiente de pH foi dissipado (segundo Bloom, 1997).

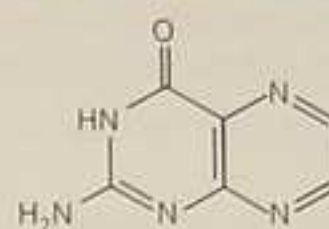
respiração (ver Capítulos 7 e 11), assim como para a captura de metabólitos nos vacúolos (ver Capítulo 6). Devido ao perigo que representam os altos níveis de amônio, os animais desenvolveram uma forte aversão ao seu odor. Como exemplo, pode-se citar os sais-de-cheiro, composto por carbonato de amônio, um vapor medicinal liberado sob o nariz para animar pessoas desfalecidas. As plantas assimilam o amônio próximo da região de absorção ou produção e rapidamente armazenam qualquer excesso nos vacúolos para evitar efeitos tóxicos nas membranas e no citosol.

Na próxima seção, será discutido o processo pelo qual o nitrato, absorvido pelas raízes por meio de um transportador de H^+-NO_3^- do tipo simporte (ver o Capítulo 6 para a discussão sobre simporte), é assimilado em compostos orgânicos e os processos enzimáticos responsáveis pela redução do nitrato primeiramente em nitrito e depois em amônio.

ASSIMILAÇÃO DO NITRATO

As plantas assimilam a maioria do nitrato absorvido por suas raízes em compostos orgânicos nitrogenados. A primeira etapa do processo é a redução do nitrato em nitrito no citoplasma (Oaks, 1994). A enzima **nitrato redutase** catalisa esta reação:

$$NO_3^- + NAD(P)H + H^+ + 2\,e^- \rightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O \qquad (12.1)$$

onde NAD(P)H indica NADH ou NADPH. A forma mais comum da enzima nitrato redutase utiliza somente o NADH como doador de elétrons; outra forma da enzima, encontrada predominantemente em tecidos não-clorofilados, como raízes, pode usar tanto o NADH quanto o NADPH (Warner e Kleinhofs, 1992).

As nitrato redutases das plantas superiores são formadas por duas subunidades idênticas com três grupos prostéticos cada: FAD (flavina adenina dinucleotídeo), heme e um complexo formado entre o molibdênio e uma molécula orgânica denominada *pterina* (Mendel e Stallmeyer, 1995; Campbell, 1999).

Uma pterina (completamente oxidada)

Nitrato redutase é a principal proteína contendo molibdênio encontrada nos tecidos vegetativos e um dos sintomas da deficiência do molibdênio é o acúmulo de nitrato, devido à diminuição da atividade da nitrato redutase.

A comparação entre as seqüências de aminoácidos da nitrato redutase de diversas espécies com aquelas de outras proteínas já caracterizadas que se ligam ao FAD, heme ou ao molibdênio, resultou em um modelo para a nitrato redutase com três domínios apresentados na Figura 12.3. O domínio de ligação do FAD aceita dois elétrons do NADH ou do NADPH. Os elétrons são deslocados pelo domínio heme para o complexo molibdênio, onde são transferidos para o nitrato.

O nitrato, a luz e os carboidratos regulam a nitrato redutase

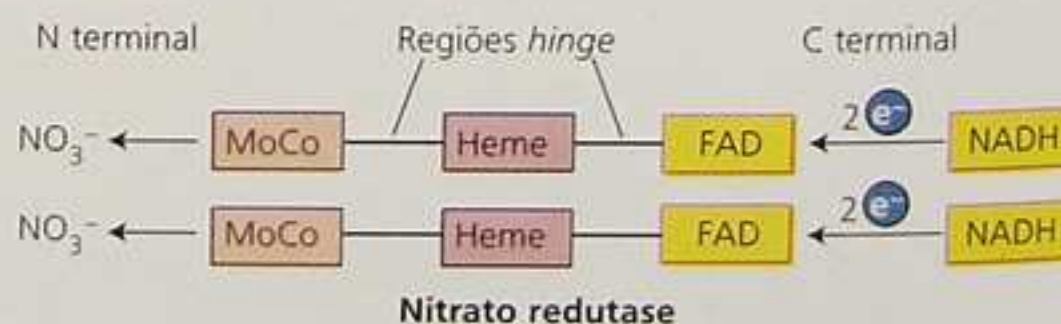
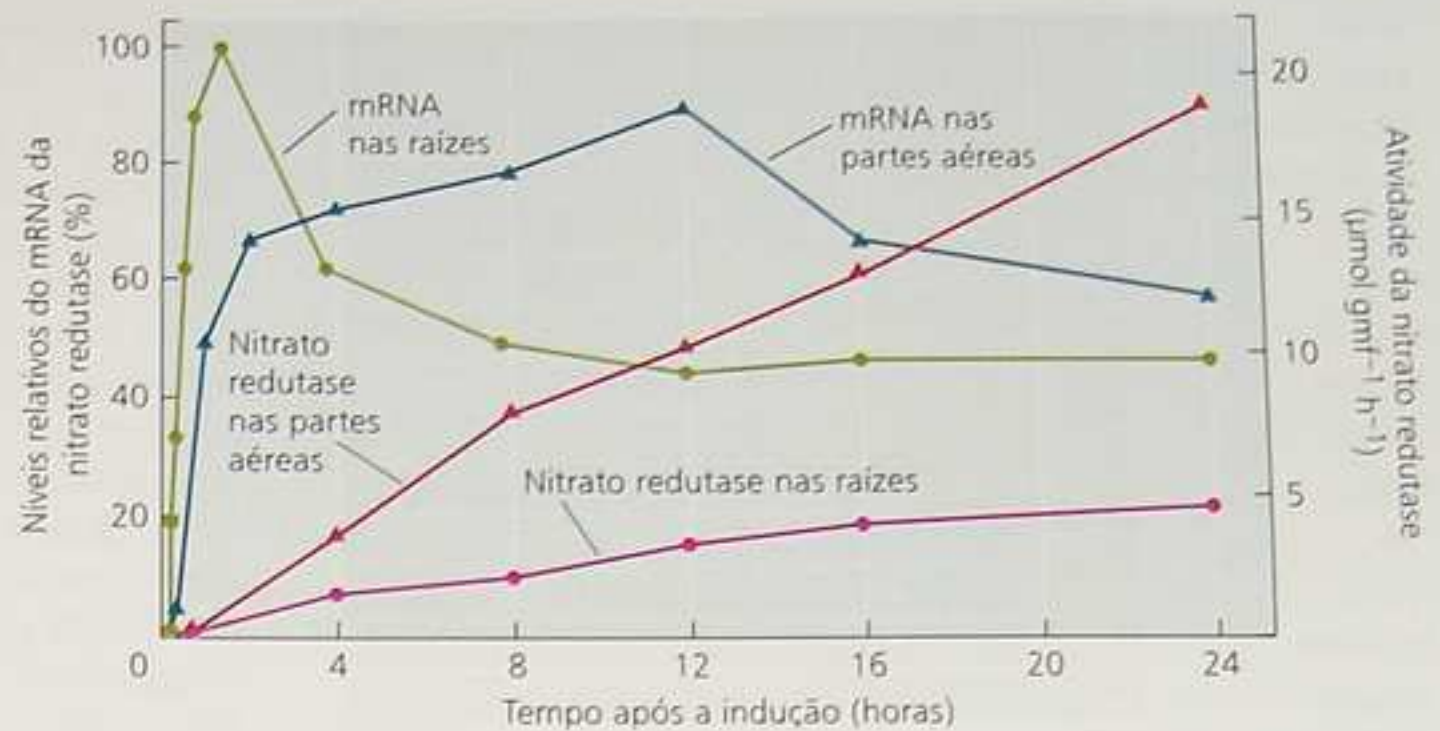
O nitrato, a luz e os carboidratos interferem na nitrato redutase em nível de transcrição e tradução (Sivasankar e Oaks, 1996). Em plântulas de cevada, o mRNA da nitrato redutase foi detectado aproximadamente 40 minutos após a adição do nitrato, sendo os níveis máximos obtidos em três horas (Figura 12.4). Ao contrá-

Nitrato redutase

FIGURA 12.3 Modelo do dímero da nitrato redutase indicando os três domínios de ligação, dos quais as seqüências de polipeptídeos são similares nos eucariontes: complexo molibdênio (CoMo), grupo heme e FAD. O NADH liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), através de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O nitrato é reduzido no complexo molibdênio próximo à região amino terminal. As seqüências dos polipeptídeos nas regiões *hinge* são altamente variáveis entre as espécies.

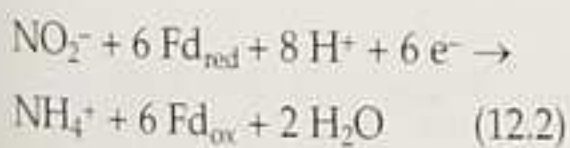
FIGURA 12.4 O aumento da atividade da nitrato redutase resulta da indução da síntese do mRNA da enzima em partes aéreas e raízes de cevada; gmf, grama de massa fresca (Kleinhofs e cols., 1989).

rio do rápido acúmulo do mRNA, houve um incremento gradual linear na atividade da nitrato redutase, refletindo a síntese mais lenta da proteína.

Além disso, a proteína sofre também uma modulação pós-tradução (envolvendo uma fosforilação reversível) análoga à regulação da sacarose fosfato sintase (ver Capítulos 8 e 10). A luz e os níveis de carboidratos, além de outros fatores ambientais, estimulam a proteína fosfatase, que desfosforila vários resíduos de serina na proteína nitrato redutase, promovendo a ativação da enzima.

Agindo na direção inversa, o escuro e o Mg^+ estimulam a proteína quinase, a qual fosforila os mesmos resíduos de serina, interagindo com a proteína inibidora 14-3-3 e inativando a nitrato redutase (Kaiser e cols., 1999). *A regulação da atividade da nitrato redutase através da fosforilação e da desfosforilação possibilita um controle mais rápido do que o obtido através da síntese ou degradação da enzima (minutos* versus *horas).*

A nitrito redutase converte o nitrito em amônio

O nitrito (NO_2^-) é um íon altamente reativo e potencialmente tóxico. As células vegetais transportam rapidamente o nitrito originado pela redução do nitrato (ver Equação 12.1) do citosol para o interior dos cloroplastos nas folhas e nos plastídeos nas raízes. Nessas organelas, a enzima nitrito redutase reduz o nitrito a amônio de acordo com a seguinte reação geral:

$$NO_2^- + 6\ Fd_{red} + 8\ H^+ + 6\ e^- \rightarrow$$
$$NH_4^+ + 6\ Fd_{ox} + 2\ H_2O \qquad (12.2)$$

onde o Fd representa a ferredoxina e os símbolos subscritos *red* e *ox*, forma reduzida e oxidada, respectivamente. A ferredoxina reduzida deriva do transporte de elétrons da fotossíntese nos cloroplastos (ver Capítulo 7) e do NADPH gerado pela via da oxidação da pentose fosfato nos tecidos não-clorofilados (ver Capítulo 11).

Tanto os cloroplastos quanto os plastídeos das raízes possuem diferentes formas da enzima, contudo ambas as formas consistem de um único polipeptídeo com dois grupos prostéticos: um grupo ferro-enxofre, Fe_4S_4, e um grupo heme especializado (Siegel e Wilkerson, 1989). Tais grupos agem conjuntamente ligando-se ao nitrito e o reduzindo-o diretamente a amônio, sem acumular compostos nitrogenados em estado redox intermediários. O fluxo de elétrons pela ferredoxina, Fe_4S_4, e heme podem ser representados, conforme a Figura 12.5.

A nitrito redutase é codificada no núcleo e sintetizada no citoplasma, apresentando um peptídeo de trânsito N-terminal que direciona o seu deslocamento para os plastídeos (Wray, 1993). Enquanto o NO_3^- e a luz induzem a transcrição do mRNA da nitrito redutase, os produtos finais do processo — asparagina e glutamina — reprimem essa indução.

As plantas podem assimilar nitrato tanto nas raízes quanto nas partes aéreas

Em muitas plantas, quando as raízes recebem pequenas quantidades de nitrato, é o mesmo reduzido principalmente nesses órgãos. À medida que o suprimento de nitrato aumenta, uma proporção maior do nitrato absorvido é translocado para as partes aéreas onde será assimilado (Marschner, 1995). Mesmo sob condições similares de disponibilidade do nitrato, o balanço do metabolismo do nitrato entre raízes e a parte aérea — conforme

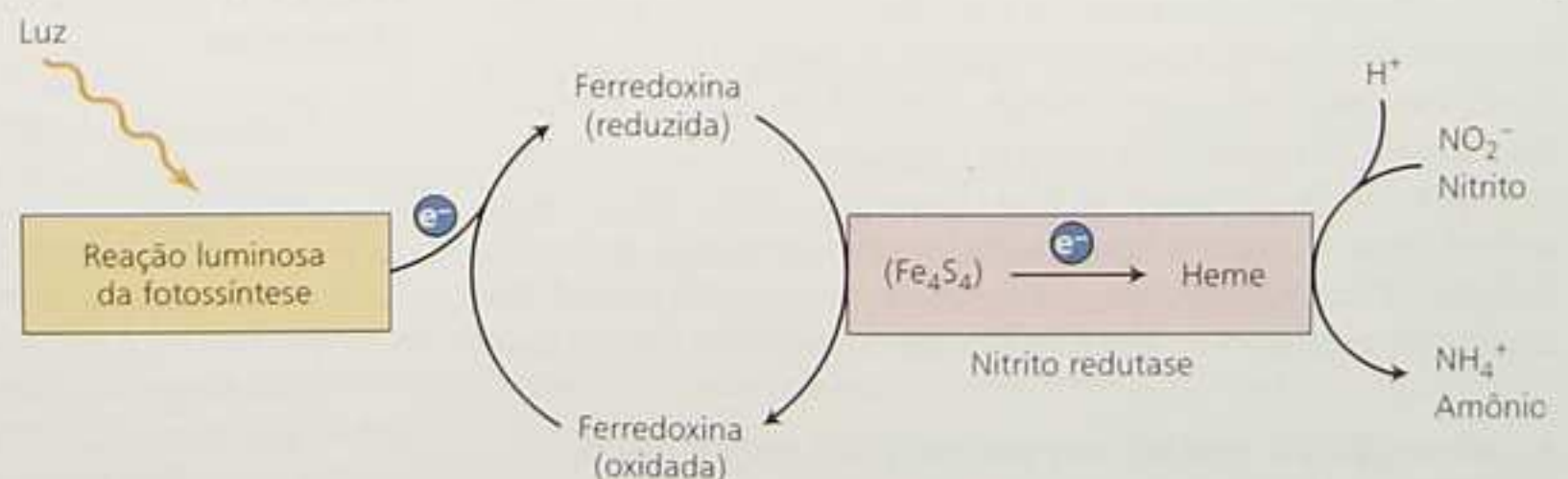



FIGURA 12.5 Modelo do acoplamento do fluxo de elétrons da fotossíntese, via ferredoxina, com a redução do nitrito pela nitrito redutase. A enzima nitrito redutase possui dois grupos prostéticos, Fe_4S_4 e heme, os quais participam na redução do nitrito a amônio.

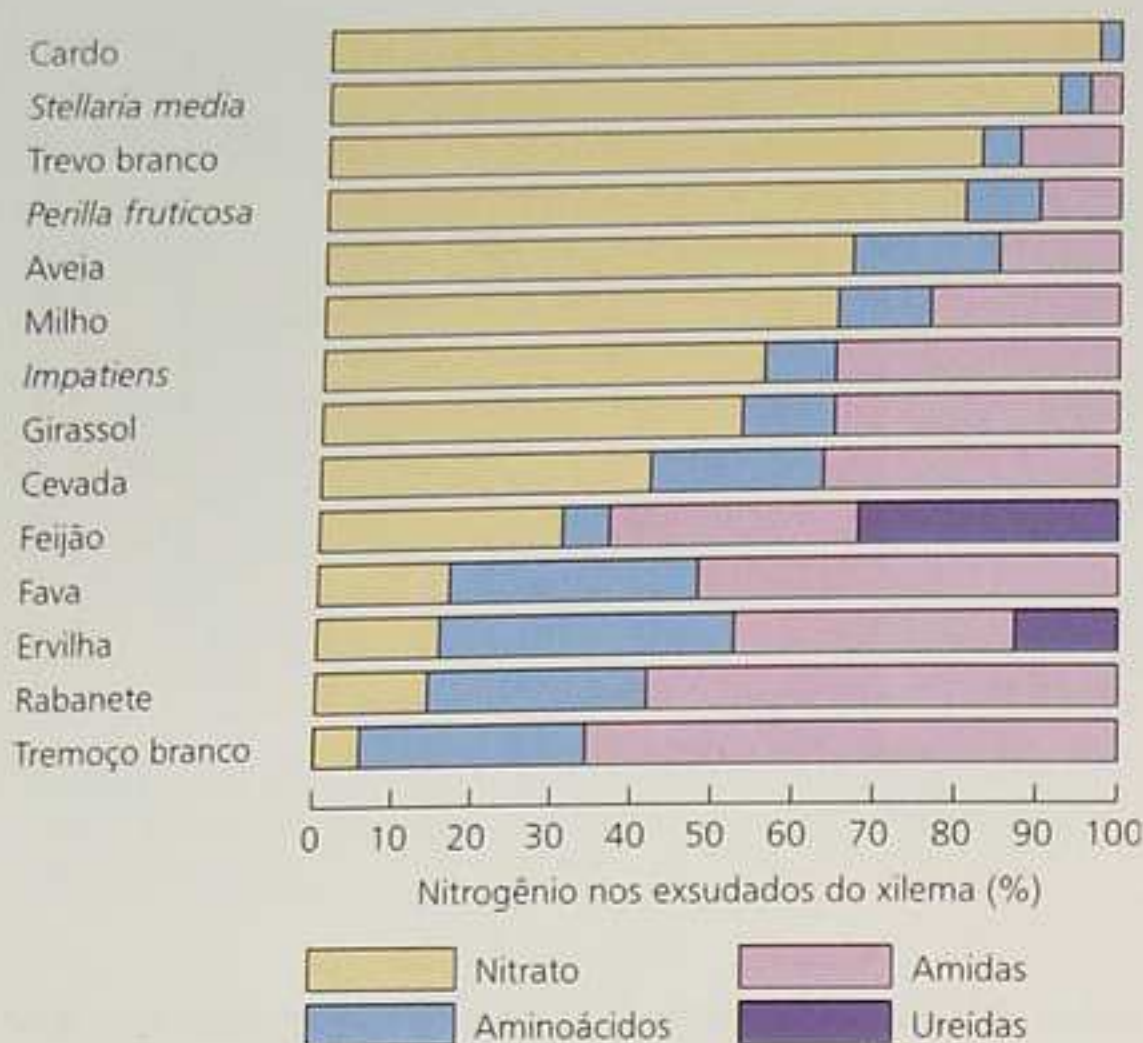



FIGURA 12.6 Quantidades relativas de nitrato e outros compostos nitrogenados do exsudados do xilema de várias espécies vegetais. As plantas foram cultivadas com as suas raízes expostas a soluções de nitrato e a seiva do xilema foi coletada por rompimento do caule. Observe a presença de ureídas, compostos nitrogenados especializados, em feijão e ervilha (que será discutido posteriormente no texto) (Pate, 1983).

indicado pela proporção da atividade da nitrato redutase em cada um dos dois órgãos ou pelas concentrações relativas do nitrato e do nitrogênio reduzido na seiva do xilema — varia de espécie para espécie.

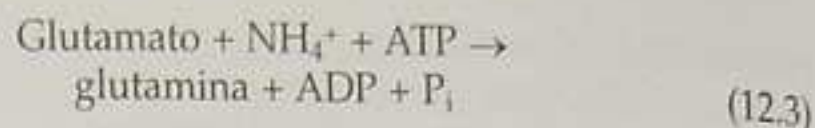
Nas plantas como o cardo (*Xanthium strumarium*), o metabolismo dos nitratos é restrito às partes aéreas; em outras plantas, como o tremoço branco (*Lupinus albus*), a maior parte do nitrato é metabolizado nas raízes (Figura 12.6). Em geral, as espécies nativas de regiões de clima temperado dependem mais intensamente da assimilação do nitrato pelas raízes do que as espécies das regiões tropicais e subtropicais.

ASSIMILAÇÃO DO AMÔNIO

As células vegetais evitam a toxicidade do amônio pela rápida conversão do amônio gerado a partir da assimilação do nitrato ou da fotorrespiração (ver Capítulo 8) em aminoácidos. A principal via para esta conversão envolve a ação seqüencial da glutamina sintetase e da glutamato sintase (Lea e cols., 1992). Nesta seção serão discutidos os processos enzimáticos responsáveis pela assimilação do amônio em aminoácidos essenciais, além do papel das amidas na regulação do metabolismo do nitrogênio e do carbono.

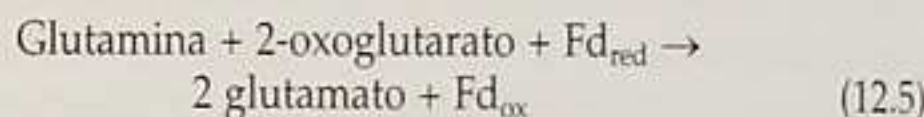
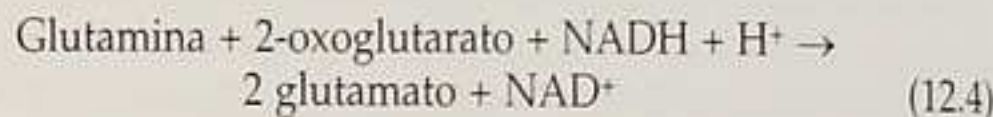
A conversão do amônio em aminoácidos requer duas enzimas

A **glutamina sintetase (GS)** combina o amônio com o glutamato para formar a glutamina (Figura 12.7A):

$$\text{Glutamato} + NH_4^+ + \text{ATP} \rightarrow \text{glutamina} + \text{ADP} + P_i \quad (12.3)$$

Esta reação necessita a hidrólise de uma molécula de ATP e envolve um cátion bivalente, como o Mg^{2+}, Mn^{2+} ou Co^{2+} como cofator. As plantas possuem duas classes de GS, uma no citosol e a outra nos plastídeos das raízes ou nos cloroplastos das partes aéreas. As formas citosólicas são expressas durante a germinação de sementes ou no feixe vascular das raízes e partes aéreas, produzindo glutamina para o transporte do nitrogênio intracelular. A GS nos plastídeos das raízes forma o nitrogênio amida que é consumido localmente, enquanto que a GS dos cloroplastos das partes aéreas reassimila o NH_4^+ da fotorrespiração (Lam e cols., 1996). Tanto os níveis de carboidratos quanto os de luz alteram a expressão das formas dessa enzima presentes nos plastídeos, mas apresentam pouco efeito nas formas citosólicas.

Os níveis elevados de glutamina nos plastídeos estimulam a atividade da **glutamato sintase** (conhecido como *glutamina: 2-oxoglutarato aminotransferase*, ou **GOGAT**). Essa enzima transfere o grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (ver Figura 12.7A). As plantas possuem dois tipos de GOGAT: um recebe elétrons do NADH, e o outro, elétrons da ferredoxina (Fd):

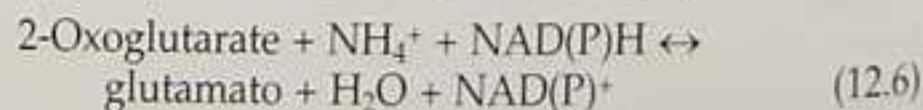
$$\text{Glutamina} + \text{2-oxoglutarato} + \text{NADH} + H^+ \rightarrow 2\ \text{glutamato} + \text{NAD}^+ \quad (12.4)$$

$$\text{Glutamina} + \text{2-oxoglutarato} + Fd_{red} \rightarrow 2\ \text{glutamato} + Fd_{ox} \quad (12.5)$$

A enzima do tipo NADH (NADH-GOGAT) está localizada nos plastídeos de tecidos não-fotossintéticos como raízes ou feixes vasculares de folhas em desenvolvimento. Nas raízes, a NADH-GOGAT está envolvida na assimilação do NH_4^+ absorvido da rizosfera (porção do solo localizado próximo a superfície das raízes), enquanto que, nos feixes vasculares de folhas em desenvolvimento, a NADH-GOGAT assimila a glutamina translocada das raízes ou das folhas senescentes.

A glutamato sintase do tipo ferredoxina-dependente (Fd-GOGAT) é encontrada nos cloroplastos e age no metabolismo fotorrespiratório do nitrogênio. Tanto a quantidade da proteína quanto a sua atividade aumentam com os níveis de luz. As raízes, em particular naquelas sob nutrição com nitrato, têm Fd-GOGAT nos plastídeos. Provavelmente, a finalidade da Fd-GOGAT das raízes seja incorporar a glutamina gerada durante a assimilação do nitrato.

O amônio pode ser assimilado através de uma rota alternativa

A **glutamato desidrogenase (GDH)** catalisa uma reação reversível que sintetiza ou desamina o glutamato (Figura 12.7B):

$$\text{2-Oxoglutarate} + NH_4^+ + \text{NAD(P)H} \leftrightarrow \text{glutamato} + H_2O + \text{NAD(P)}^+ \quad (12.6)$$

Uma forma NADH-dependente do GDH é encontrada nas mitocôndrias e uma forma NADPH-dependente ocorre nos cloroplastos de órgãos fotossintéticos. Embora ambas as formas sejam relativamente abundantes, elas não podem substituir a rota da GS-GOGAT para a assimilação do amônio, tendo como função principal desaminar o glutamato (ver Figura 12.7B).

(A)

Glutamina sintetase (GS)

Glutamato sintase (GOGAT)

ATP → ADP + P_i

NADH + H^+ ou Fd_{red} → NAD^+ ou Fd_{ox}

Amônio NH_4^+ + Glutamato → Glutamina + 2-Oxoglutarato → 2 Glutamatos

(B)

Glutamato desidrogenase (GDH)

NAD(P)H ⇄ NAD(P)$^+$

Amônio NH_4^+ + 2-Oxoglutarato ⇄ Glutamato + H_2O

(C)

Aspartato aminotransferase (Asp-AT)

Glutamato + Oxalacetato → Aspartato + 2-Oxoglutarato

(D)

Asparagina sintetase (AS)

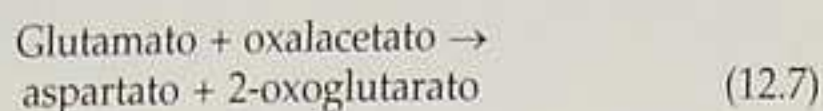
ATP → ADP + PP$_i$

Glutamina + Aspartato → Asparagina + Glutamato

FIGURA 12.7 Estrutura e rotas de síntese de compostos envolvidos no metabolismo do amônio. O amônio pode ser assimilado por um dos vários processos. (A) A rota da GS-GOGAT que forma a glutamina e o glutamato. É necessário um co-fator reduzido para a reação: ferredoxina nas folhas verdes e o NADH nos tecidos não-fotossintéticos. (B) A rota do GDH que forma o glutamato, utilizando o NADH ou o NADPH como um agente redutor. (C) Transferência do grupo amino do glutamato para o oxalacetato para formar o aspartato (catalisado pela enzima aspartato aminotransferase). (D) Síntese da asparagina pela transferência de um grupo aminoácido da glutamina para o aspartato (catalisada pela enzima asparagina sintetase).

As reações de transaminação transferem o nitrogênio

Uma vez assimilado em glutamina e glutamato, o nitrogênio é incorporado em outros aminoácidos por meio de reações de transaminação. As enzimas que catalisam tais reações são conhecidas como aminotransferases. Um exemplo é o **aspartato aminotransferase (Asp-AT)**, que catalisa a seguinte reação (Figura 12.7C):

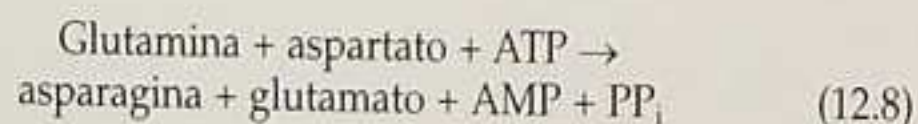
$$\text{Glutamato} + \text{oxalacetato} \rightarrow \text{aspartato} + \text{2-oxoglutarato} \quad (12.7)$$

no qual o grupo amino do glutamato é transferido para o átomo carboxil do aspartato. O aspartato é um aminoácido que participa do transporte malato-aspartato, no processo de transferência de equivalentes redutores das mitocôndrias e cloroplastos para o citosol (ver Capítulo 11) e no transporte do carbono a partir das células do mesofilo até a bainha do feixe vascular no processo de fixação C4 do carbono (ver Capítulo 8). Todas as reações de transaminação requerem o piridoxal fosfato (vitamina B_6) como co-fator.

As aminotransferases são encontradas no citoplasma, nos cloroplastos, nas mitocôndrias, nos glioxissomos e nos peroxissomos. As aminotransferases localizadas nos cloroplastos podem desempenhar um importante papel na biossíntese dos aminoácidos, pois folhas ou cloroplastos isolados expostos ao dióxido de carbono marcado radiotivamente, incorporam com rapidez a marca em glutamato, aspartato, alanina, serina e glicina.

A asparagina e a glutamina unem o metabolismo do carbono e do nitrogênio

A asparagina, isolada pela primeira vez do aspargo em 1806, foi a primeira amida a ser identificada (Lam e cols., 1996). Esse aminoácido não atua apenas como um precursor de proteína, mas como um elemento-chave no transporte e no armazenamento do nitrogênio, devido à sua estabilidade e à alta razão nitrogênio:carbono (2N para 4C da asparagina, contra 2N para 5C da glutamina e 1N para 5C do glutamato).

A principal rota para a síntese da asparagina envolve a transferência do nitrogênio amida da glutamina para a asparagina (Figura 12.7D):

$$\text{Glutamina} + \text{aspartato} + \text{ATP} \rightarrow \text{asparagina} + \text{glutamato} + \text{AMP} + \text{PP}_i \quad (12.8)$$

A **asparagina sintetase (AS)**, a enzima que catalisa esta reação, é encontrada no citosol das células das folhas e raízes e nos nódulos que fixam o nitrogênio (ver a próxima seção). Em raízes de milho, sobretudo aquelas sob níveis potencialmente tóxicos de amônia, o amônio pode substituir a glutamina como fonte do grupo amida (Sivasankar e Oaks, 1996).

Altos níveis de luz e de carboidratos — condições que estimulam a GS e a Fd-GOGAT dos plastídeos — inibem a expressão dos genes que codificam AS e a atividade da enzima. A regulação antagônica dessas rotas competitivas auxilia no balanço do metabolismo do carbono e do nitrogênio nos vegetais (Lam e cols., 1996). As condições de ampla energia (i. é, com altos níveis de luz e de carboidratos) estimulam a GS e a GOGAT, inibem a AS e assim favorecem a assimilação do nitrogênio em glutamina e em glutamato, compostos ricos em carbono e que participam na síntese de novos compostos nos vegetais.

Por comparação, em condições limitadas de energia ocorre a inibição da GS e da GOGAT e a estimulação da AS, resultando na assimilação favorável do nitrogênio em asparagina, um composto rico em nitrogênio e suficientemente estável para ser transportado em longas distâncias e armazenado por muito tempo.

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A fixação biológica representa a forma mais importante de fixar o nitrogênio atmosférico N_2 em amônio, representando, assim, o ponto-chave do ingresso do nitrogênio molecular no ciclo biogeoquímico do nitrogênio (ver Figura 12.1). Nesta seção, serão abordadas as propriedades das enzimas nitrogenases, responsáveis pela fixação do nitrogênio, as reações simbiontes entre organismos fixadores do nitrogênio e plantas superiores, a formação de estruturas especializadas nas raízes infectadas por bactérias fixadores do nitrogênio, as interações genéticas e sinalizadoras que regulam a fixação do nitrogênio pelos procariontes simbiontes e seus hospedeiros.

Bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre e simbiontes

Conforme já mencionado, certas bactérias podem converter o nitrogênio atmosférico em amônio (Tabela 12.2). A maior parte desses organismos procariontes fixadores de nitrogênio tem vida livre no solo. Poucos formam associações simbiontes com plantas superiores, nas quais o procarionte fornece diretamente à planta hospedeira o nitrogênio fixado em troca de outros nutrientes e carboidratos (Tabela 12.2). Tais simbioses ocorrem nos nódulos formados nas raízes dos vegetais contendo bactérias fixadoras.

O tipo mais comum de simbiose ocorre entre as espécies da família *Leguminosae* e as bactérias de solo dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (coletivamente chamados de **rizóbios**; Tabela 12.3 e Figura 12.8). Outro tipo comum de simbiose ocorre entre várias espécies de plantas lenhosas, como árvores do gênero *Alnus*, e bactérias do solo do gênero *Frankia*. Podem ser encontrados, ainda, outros tipos de associações entre herbáceas da América do Sul do gênero *Gunnera* e pteridófitas do gênero *Azolla*, as quais formam associações com cianobactérias *Nostoc* e *Anabaena*, respectivamente (ver Tabela 12.2 e Figura 12.9).

A fixação do nitrogênio requer condições anaeróbicas

Em decorrência da irreversível inativação que o oxigênio provoca na enzima nitrogenase, envolvida na fixação do nitrogênio, este deve ser fixado sob condições anaeróbicas. Assim, cada organismo fixador de nitrogênio listado na Tabela 12.2 funciona em condições naturais de ausência de oxigênio ou desenvolve condições internas de anaerobiose, mesmo na presença do oxigênio.

Nas cianobactérias, as condições de anaerobiose são criadas em células especializadas denominadas *heterocistos* (ver Figura 12.9). Os heterocistos são células com paredes espessadas, que se diferenciam quando as cianobactérias filamentosas são privadas do NH_4^+. Tais células não apresentam o fotossistema II, o qual produz o oxigênio nos cloroplastos (ver Capítulo 7); assim, elas não produzem oxigênio (Burris, 1976). Os heterocistos parecem representar uma adaptação para que ocorra a fixação do nitrogênio, sendo largamente encontrados entre as cianobactérias aeróbicas fixadoras do nitrogênio.

TABELA 12.2
Exemplos de organismos que podem realizar a fixação do nitrogênio

Fixação simbionte do nitrogênio	
Planta hospedeira	**Fixação simbionte de N**
Legumes: leguminosas e *Parasponia*	*Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium*
Actinorrízicas: *Alnus* (árvore), *Ceanothus* (arbusto), *Casuarina* (árvore), *Datisca* (arbusto)	*Frankia*
Gunnera	*Nostoc*
Azolla (pteridófita aquática)	*Anabaena*
Cana-de-açúcar	*Acetobacter*
Fixadores de nitrogênio de vida livre	
Tipo	**Gêneros fixadores de N**
Cianobactérias (algas azuis-esverdeadas)	*Anabaena, Calothrix, Nostoc*
Outras bactérias	
Aeróbicas	*Azospirillum, Azotobacter, Beijerinckia, Derxia*
Facultativas	*Bacillus Klebsiella*
Anaeróbicas	
Não-fotossintetizantes	*Clostridium, Methanococcus* (Archaebacteria)
Fotossintetizantes	*Chromatium, Rhodospirillum*

As cianobactérias podem fixar o nitrogênio em condições de anaerobiose, como aquelas encontradas em campos alagados. Nos países asiáticos, ambos os tipos de cianobactérias fixadoras do nitrogênio, com ou sem os heterocistos, representam o principal modo de manutenção de um suprimento adequado de nitrogênio no solo das plantações de arroz. Esses microrganismos fixam o nitrogênio quando os campos estão alagados e morrem quando secam, liberando o nitrogênio fixado para o solo. Uma outra fonte importante de nitrogênio em campos alagados cultivados com arroz é a pteridófita aquática *Azolla*, a qual se associa com a cianobactéria *Anabaena*. A associação *Azolla-Anabaena* pode fixar 0,5 Kg de nitrogênio atmosférico por hectare/dia, uma taxa de fertilização suficiente para manter uma lavoura de arroz.

As bactérias de vida livre, capazes de fixar nitrogênio, podem ser aeróbicas, facultativas ou anaeróbicas (ver Tabela 12.2).

- Bactérias *aeróbicas* fixadoras de nitrogênio, como a *Azotobacter*, mantêm condições reduzidas de oxigênio (condições mi-

TABELA 12.3
Associações entre plantas hospedeiras e rizóbios

Planta hospedeira	**Rizóbios simbiontes**
Parasponia (não-leguminosa, antigamente chamada de *Trema*)	*Bradyrhyzobium* spp.
Soja (*Glycine max*)	*Bradyrhyzobium japonicum* (tipo com crescimento lento)
	Sinorhizobium fredii (tipo com crescimento rápido)
Alfafa (*Medicago sativa*)	*Sinorhizobium meliloti*
Sesbania (aquática)	*Azorhizobium* (forma nódulos nas raízes e no caule; no caule se desenvolvem raízes adventícias)
Feijão (*Phaseolus*)	*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*; *Rhizobium tropicii*; *Rhizobium etli*
Trevo (*Trifolium*)	*Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*
Ervilha (*Pisum sativum*)	*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*
Aeschenomene (aquática)	*Photorhizobium* (rizóbios fotossinteticamente ativos, que formam nódulos no caule, provavelmente associados a raízes adventícias)

FIGURA 12.8 Nódulos em raiz em soja. Os nódulos são o resultado da infecção por *Rhizobium japonicum* (© Wally Eberhart/Visuals Unlimited).

croaeróbicas) por meio das suas altas taxas de respiração (Burris, 1976). Outras, como a *Gloeothece*, liberam o O_2 fotossintético durante o dia e fixam o nitrogênio durante a noite.

- Organismos *facultativos* capazes de crescer sob condições aeróbicas e anaeróbicas, geralmente fixando o nitrogênio somente sob condições anaeróbicas.
- Para as bactérias *anaeróbicas* fixadoras de nitrogênio, o oxigênio não representa um problema, pois está ausente no ambiente. Tais organismos podem ser tanto fotossintetizantes (como *Rhodospirillum*) quanto não-fotossintetizantes (como *Clostridium*).

A fixação simbionte do nitrogênio ocorre em estruturas especializadas

Os organismos procariontes simbiontes fixadores de nitrogênio ocorrem no interior de nódulos, órgãos especiais da planta hospedeira que contêm as bactérias fixadoras (ver Figura 12.8). No caso do gênero *Gunnera*, esses órgãos ocorrem em glândulas do caule, que se desenvolvem independentemente do organismo simbionte. No caso das leguminosas e das plantas actinorrízicas, as bactérias fixadoras de nitrogênio induzem a formação de nódulos nas raízes.

As gramíneas também podem desenvolver relações simbiontes com organismos fixadores de nitrogênio, mas nessas associações os nódulos não são produzidos. No caso, a bactéria fixadora de nitrogênio coloniza os tecidos do vegetal ou se ancora na superfície da raiz, principalmente próximas da zona de alongamento e dos pêlos radiculares (ver Glossário) (Reis e cols., 2000). Por exemplo, a bactéria fixadora de nitrogênio *Acetobacter diazotrophicus* vive no apoplasto dos tecidos do caule de cana-de-açúcar e pode suprir o seu hospedeiro com nitrogênio suficiente para garantir a sua independência de fertilizantes nitrogenados (Dong e cols., 1994). O potencial para a aplicação de *Azospirillum* em milho e em outros grãos tem sido explorado, porém esse organismo parece fixar pouco nitrogênio quando associado a plantas (Vande Broek e Vanderleyden, 1995).

As plantas leguminosas e actinorrízicas regulam a permeabilidade dos gases nos seus nódulos, mantendo ali um nível de oxigênio que pode sustentar a respiração, mas é suficientemente baixo para evitar a inativação da nitrogenase (Kuzma e cols., 1993). A permeabilidade gasosa aumenta na luz e decresce sob condições de seca ou exposição ao nitrato. O mecanismo de regulação da permeabilidade gasosa ainda não é conhecido.

Os nódulos possuem uma heme proteína que se liga ao oxigênio chamada de **leg-hemoglobina**, a qual está presente em altas concentrações (700 μM nos nódulos de soja) no citoplasma das células infectadas do nódulo, conferindo a esses nódulos uma cor rosada. A planta hospedeira produz a porção globina da leg-hemoglobina em resposta à infecção pela bactéria (Marschner, 1995); a bactéria simbionte produz a porção heme. A leg-hemoglobina apresenta uma alta afinidade pelo oxigênio (K_m de aproximadamente 0,01 μM), cerca de 10 vezes mais alta do que a cadeia β da hemoglobina humana.

Embora se acreditasse que a leg-hemoglobina agisse como um tampão para o oxigênio do nódulo, estudos recentes indicam que ela armazena uma quantidade suficiente de oxigênio para a manutenção da respiração nodular por poucos segundos (Denison e Harter, 1995). Sua função é auxiliar o transporte do oxigênio para a respiração das células bacterianas simbióticas, de maneira análoga ao transporte de oxigênio realizado pela hemoglobina nos tecidos dos animais (Ludwig e de Vries, 1986).

O estabelecimento da simbiose requer uma troca de sinais

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios não é obrigatória. As plântulas de leguminosas desenvolvem-se sem qualquer associação com rizóbios e podem permanecer em tal condição durante todo o seu ciclo de vida. Os rizóbios também ocorrem como organismos de vida livre no solo. Entretanto, sob condições limitantes de nitrogênio, os simbiontes procuram uns aos outros, por meio de uma elaborada troca de sinais. A sinalização, o processo de infecção e o desenvolvimento de nódulos fixadores de nitrogênio envolvem genes específicos tanto da planta hospedeira quanto dos simbiontes.

Os genes vegetais específicos de nódulos são denominados genes **nodulinos** (*Nod*), enquanto que os genes dos rizóbios participantes da formação dos nódulos são chamados de genes de **nodulação** (*nod*) (Heidstra e Bisseling, 1996). Os genes *nod* são classificados como *nod* gerais e genes *nod* hospedeiro-específico. Os genes *nod* gerais — *nodA*, *nodB* e *nodC* — são encontrados em todas as cepas de rizóbios, enquanto os genes *nod* hospedeiro-es-

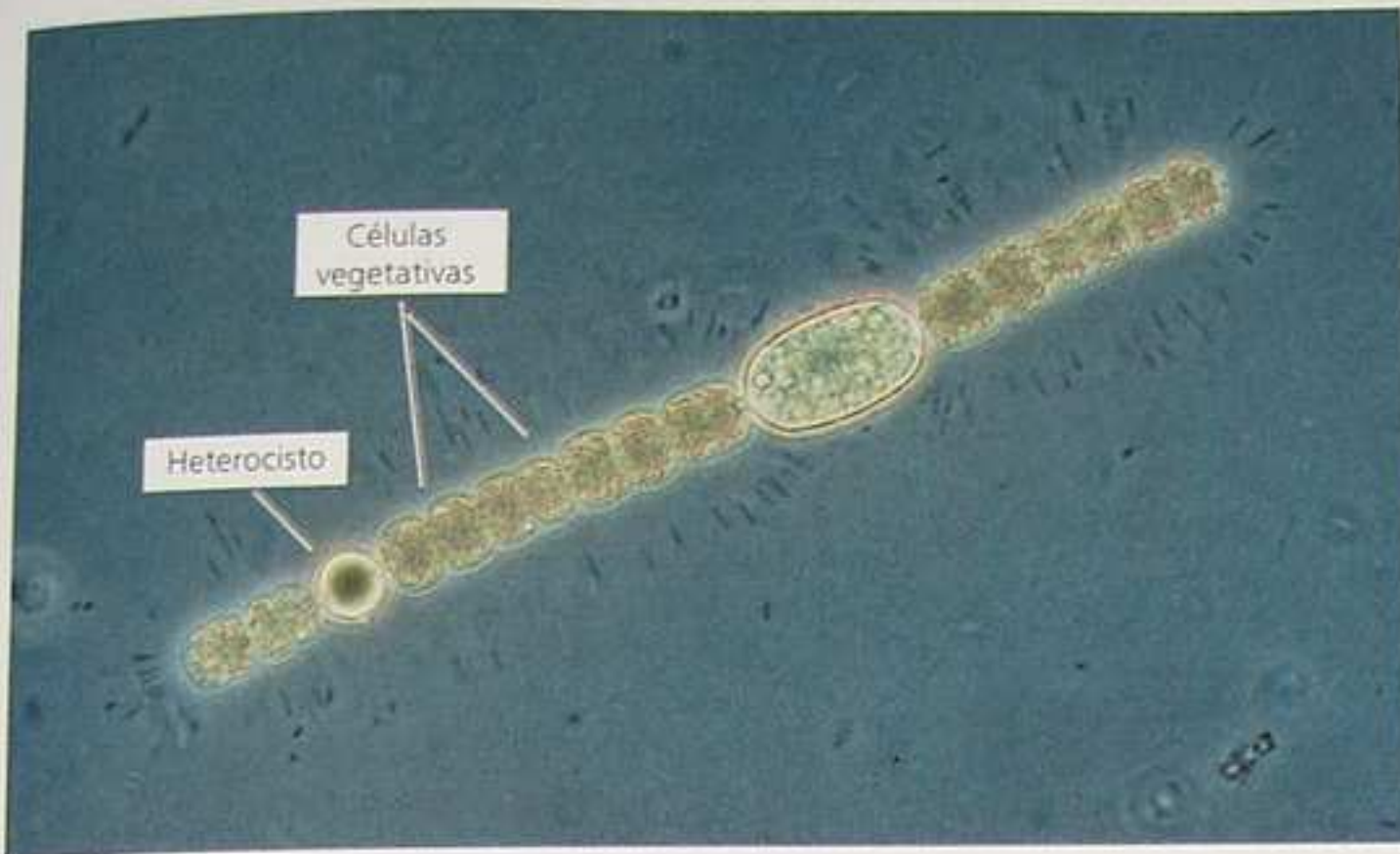



FIGURA 12.9 Um filamento de cianobactéria fixadora de nitrogênio (*Anabaena*) com um heterocisto. O heterocisto com paredes espessas, intercalado entre as células vegetativas, possui um ambiente interno anaeróbico que permite à cianobactéria fixar nitrogênio em condições aeróbicas (© Paul W. Johnson/Biological Photo Service).

pecífico — como *nodP*, *nodQ* e *nodH*, ou os *nodF*, *nodE* e *nodL* —, diferem entre as espécies de rizóbios e determinam o tipo de hospedeiros. Somente um dos genes *nod*, o gene regulador *nodD*, é constitutivamente expresso e, como será explicado em detalhe, o seu produto proteíco (NodD) regula a transcrição de outros genes *nod*.

O primeiro estádio no estabelecimento da relação simbionte entre a bactéria fixadora de nitrogênio e seu hospedeiro é a migração da bactéria em direção as raízes da planta hospedeira. Esta migração é uma resposta quimiotática, mediada por atrativos químicos, em especial (iso)flavonóides e betaínas, secretados pelas raízes. Tais atrativos ativam a proteína do rizóbio NodD, a qual induz a transcrição de outros genes *nod* (Phillips e Kapulnik, 1995). A região promotora de todos os *operons nod*, exceto a do *nodD*, possui seqüências altamente conservadas chamadas de *nod box*. A ligação da NodD ao *nod box* induz a transcrição de outros genes *nod*.

Os fatores Nod produzidos pela bactéria atuam como sinalizadores para a simbiose

Os genes *nod* ativados pelo NodD codificam as proteínas de nodulação, cuja maioria está envolvida na biossíntese dos **fatores Nod**, os quais são moléculas sinalizadoras oligossacarídeos de lipoquitina, que apresentam uma quitina β-1$\rightarrow$4 ligada a um esqueleto *N*-acetil-D-glicosamina (variando em comprimento de três a seis unidades de açúcar), além de uma cadeia acil lipídica na posição C-2 do açúcar não-redutor (Figura 12.10).

Três dos genes *nod* (*nodA*, *nodB* e *nodC*) codificam as enzimas (NodA, NodB e NodC, respectivamente) necessárias à síntese dessa estrutura básica (Stokkermans e cols., 1995):

1. A NodA é uma *N*-aciltransferase que catalisa a adição da cadeia acil lipídica.
2. A NodB é uma desacetilase quitina-oligossacarídeo que remove o grupo acetil de um açúcar terminal não-redutor.
3. A NodC é uma sintase quitina-oligossacarídeo que liga os monômeros de *N*-acetil-D-glicosamina.

Os genes *nod* hospedeiro-específicos que variam entre as espécies de rizóbios estão envolvidos na modificação das cadeia acil lipídica ou na adição de grupos importantes na determinação da especificidade do hospedeiro (Carlson e cols., 1995):

- NodE e NodF determinam o comprimento e o grau de saturação da cadeia acil lipídica; aquelas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* e *R. meliloti* resultam na síntese de grupos acil lipídicos de 18:4 e 16:2, respectivamente (rever o Capítulo 11, onde o número que antecede os dois pontos indica o número total de carbonos na cadeia acil lipídica, enquanto o número posterior indica o número de ligações duplas).
- Outras enzimas, como NodL, influenciam a especificidade do hospedeiro aos fatores Nod pela adição de substituições específicas nas porções dos açúcares redutores e não redutores do esqueleto de quitina.

Hidrogênio, sulfato, fucose ou 2-O-metil fucose
CH_2OH CH_2OH CH_2
HO HO NH HO N HO N
Ácido graxo
$C=O$ CH_3 n
Hidrogênio ou glicerol

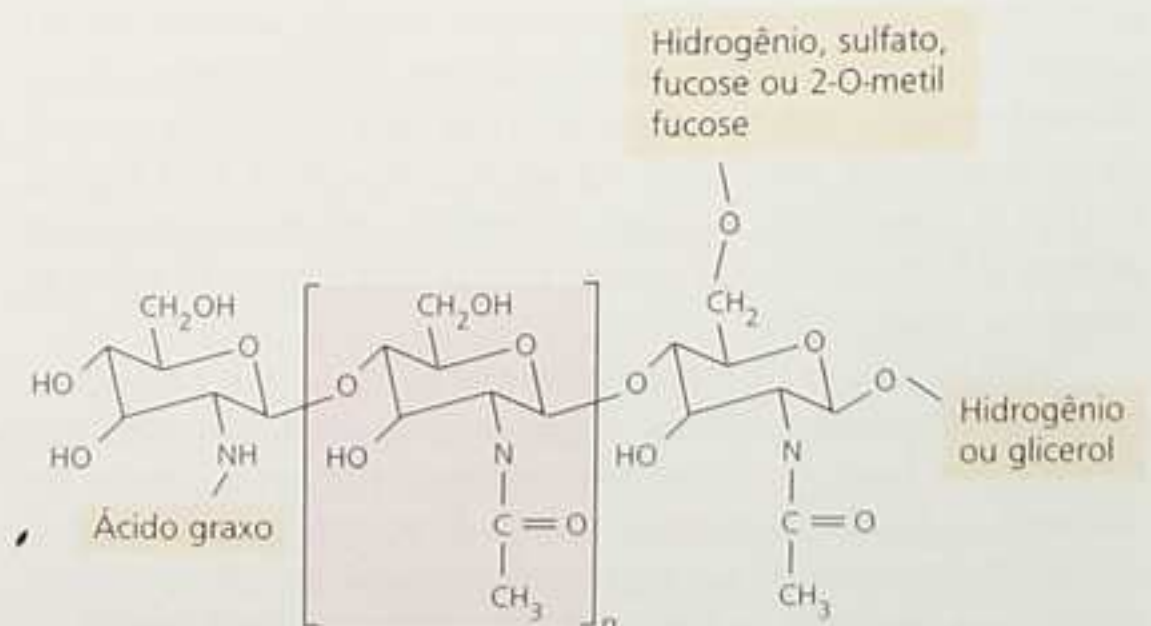



FIGURA 12.10 Os fatores Nod são oligossacarídeos de lipoquitina. A cadeia de ácido graxo apresenta normalmente de 16 a 18 carbonos. O número de sessões intermediárias repetidas (n) é geralmente dois a três (segundo Stokkermans e cols., 1995).

Uma leguminosa hospedeira em particular responde a um fator Nod específico. Os receptores da leguminosa para os fatores Nod parecem ser lectinas especiais (proteína de ligação a açúcar), produzidas nos pêlos radiculares (van Rhijn e cols., 1998; Etzler e cols., 1999). Os fatores Nod ativam estas lectinas, aumentando a hidrólise de ligações fosfoanidrida dos nucleosídeos di e trifosfato. Tal ativação da lectina direciona os rizóbios específicos aos hospedeiros apropriados e facilita a ligação dos rizóbios à parede celular do pêlo radicular.

A formação do nódulo envolve vários fitormônios

Os dois processos — infecção e organogênese do nódulo — ocorrem simultaneamente durante a formação do nódulo da raiz. Durante o processo de infecção, os rizóbios que estão ligados aos pêlos radiculares liberam os fatores Nod, que induzem um pronunciado enrolamento das células do pêlo (Figura 12.11 A e B). Os rizóbios tornam-se envolvidos por um pequeno compartimento, formado pelo enrolamento. A parede celular do pêlo radicular também é degradada nessas regiões em resposta aos fatores Nod, permitindo que as células bacterianas acessem diretamente à superfície externa da membrana plasmática (Lazarowitz e Bisseling, 1997).

A próxima etapa é a formação de um **canal de infecção** (Figura 12.11 C), uma extensão interna tubular da membrana plasmática, que é produzida pela fusão de vesículas derivadas do Golgi no local da infecção. O canal cresce no seu ápice pela fusão de vesículas secretoras na extremidade do tubo. Na região mais profunda do córtex, próximo ao xilema, as células corticais desdiferenciam-se e iniciam a divisão, formando uma área distinta no córtex, denominada *primórdio nodular*, a partir do qual o nódulo irá se desenvolver. Os primórdios nodulares são formados opostos aos pólos do protoxilema do feixe vascular da raiz (Timmers e cols., 1999) (ver **Tópico 12.1 na Internet**).

Diferentes compostos de sinalização, atuando positiva ou negativamente, controlam a posição do primórdio nodular. O nucleosídeo uridina difunde-se do estelo para o córtex, na zona do protoxilema da raiz e estimula a divisão celular (Lazarowitz e Bisseling, 1997). O etileno é sintetizado na região do periciclo, difunde-se para o córtex e bloqueia a divisão celular no pólo oposto ao floema da raiz.

O canal de infecção, preenchido pelos rizóbios em proliferação, alonga-se através do pêlo radicular e das camadas de células corticais, em direção ao primórdio nodular. Quando o canal de infecção atinge as células especializadas no nódulo, sua extremidade fusiona-se com a membrana plasmática da célula hospedeira, liberando células bacterianas envoltas por uma membrana derivada da membrana plasmática da célula hospedeira (ver Figura 12.11D). A ramificação do canal de infecção dentro dos nódulos permite a bactéria infectar muitas células (ver Figura 12.11E e F) (Maylona e cols., 1995).

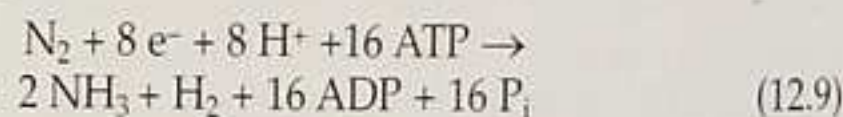
Inicialmente, as bactérias continuam a se dividir e a membrana que as envolve aumenta em superfície para acomodar esse crescimento pela fusão com vesículas menores. Logo após, a partir de um sinal da planta, as bactérias param de se dividir e começam a aumentar em tamanho e a se diferenciarem em organelas endossimbióticas fixadoras de nitrogênio denominadas **bacterióides**. A membrana que envolve os bacterióides é chamada de *membrana peribacterióide*.

O nódulo como um todo desenvolve características semelhantes a um sistema vascular (o qual facilita a troca de nitrogênio fixado produzido pelos bacterióides por nutrientes disponibilizados pela planta) e uma camada de células para excluir o O_2 do interior do nódulo da raiz. Em algumas leguminosas de clima temperado (p. ex., ervilhas), os nódulos são alongados e cilíndricos, devido à presença de um *meristema nodular*. Os nódulos de leguminosas tropicais, como soja e amendoim, não apresentam um meristema persistente, além de serem esféricos (Rolfe e Gresshoff, 1988).

FIGURA 12.11 O processo de infecção durante a organogênese do nódulo. (A) Os rizóbios ligam-se a um pêlo radicular em formação, em resposta a atrativos químicos liberados pela planta. (B) Em resposta aos fatores produzidos pela bactéria, o pêlo radicular apresenta um enrolamento anormal e as células dos rizóbios crescem dentro dos enrolamentos. (C) A degradação localizada da parede celular do pêlo radicular leva à infecção e à formação do canal de infecção a partir das vesículas secretoras do Golgi das células da raiz. (D) O canal de infecção atinge a extremidade da célula e sua membrana fusiona-se com a membrana plasmática da célula do pêlo radicular. (E) Os rizóbios são liberados no apoplasto e penetram no complexo da lamela média da membrana plasmática da célula subepidérmica, iniciando um novo canal de infecção, o qual forma um canal aberto com o primeiro. (F) O canal de infecção estende-se e se ramifica até atingir as células-alvo, onde as vesículas constituídas por membranas do vegetal, contendo bactérias, são liberadas no citosol. ▶

O complexo da enzima nitrogenase fixa o N_2

A fixação biológica do nitrogênio, semelhante à fixação industrial do nitrogênio, produz amônia a partir do nitrogênio molecular. A reação geral é:

$$N_2 + 8\,e^- + 8\,H^+ + 16\,ATP \rightarrow 2\,NH_3 + H_2 + 16\,ADP + 16\,P_i \qquad (12.9)$$

Observe que a redução do N_2 a $2NH_3$, uma transferência de seis elétrons, está associada à redução de dois prótons para formar H_2. O **complexo da enzima nitrogenase** catalisa essa reação.

O complexo da enzima nitrogenase pode ser separado em dois componentes — a Fe-proteína e a MoFe-proteína —, nenhuma delas com atividade catalítica própria (Figura 12.12):

- A Fe-proteína é a menor dos dois componentes e apresenta duas subunidades idênticas de 30 a 72 kDa cada, dependendo do organismo. Cada subunidade contém um grupo ferro-enxofre (4 Fe e 4 S^{2-}), que participa nas reações redox envolvidas na conversão de N_2 em NH_3. A Fe-proteína é irreversivelmente inativada por O_2 com uma meia-vida característica de 30 a 45 segundos (Dixon e Wheeler, 1986).
- A MoFe-proteína apresenta quatro subunidades, com massa molecular total de 180 a 235 kDa, dependendo da espécie. Cada subunidade apresenta dois grupos Mo-Fe-S. A MoFe-proteína é também inativada pelo oxigênio, com a meia-vida de 10 minutos no ar.

Na reação geral de redução do nitrogênio (ver Figura 12.12), a ferredoxina atua como um doador de elétrons para a Fe-proteína, a qual, por sua vez, hidrolisa ATP e reduz a MoFe-proteína. A MoFe-proteína pode, então, reduzir inúmeros substratos (Tabela 12.4),

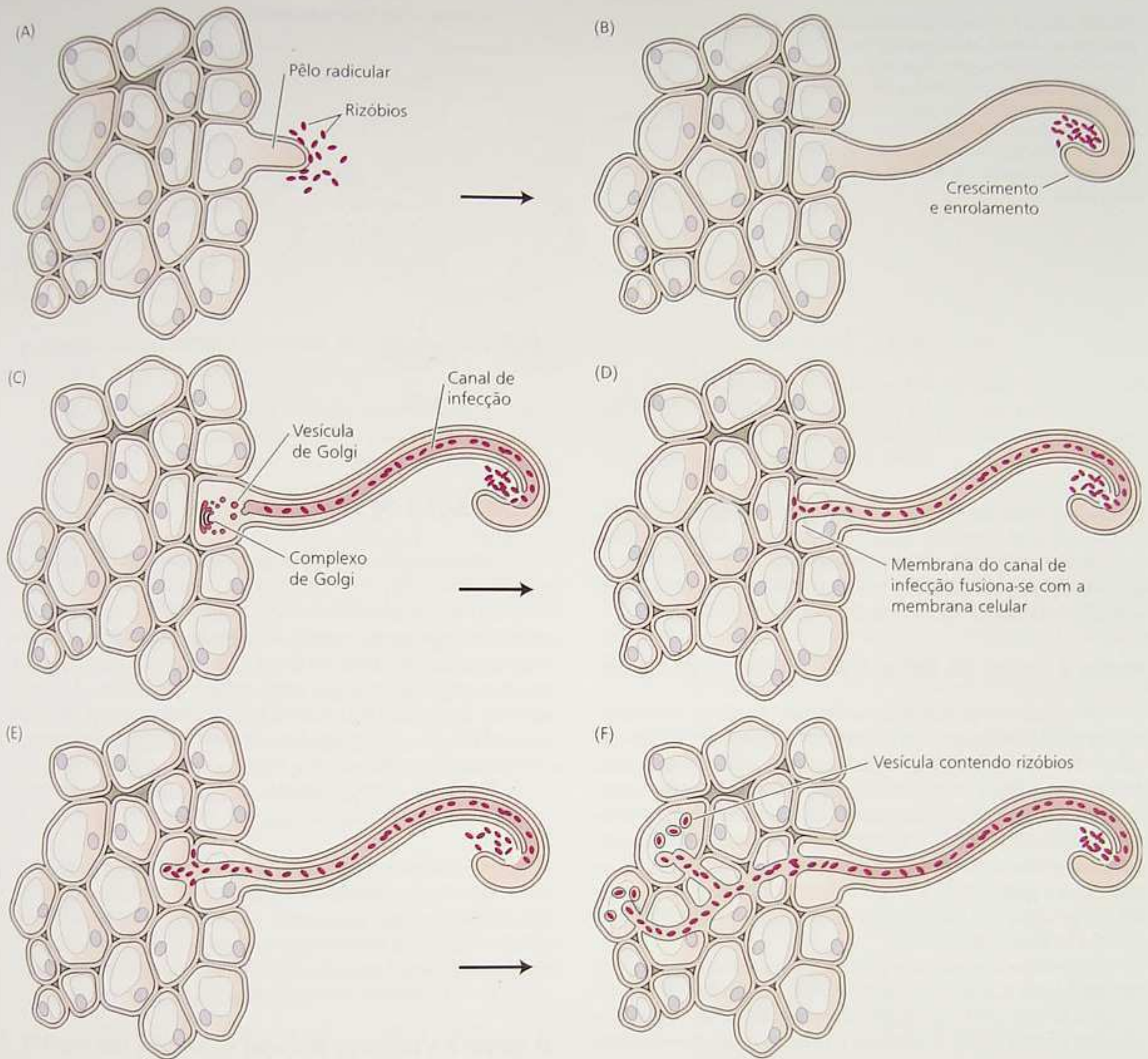
(A) Pêlo radicular Rizóbios

(B) Crescimento e enrolamento

(C) Canal de infecção Vesícula de Golgi Complexo de Golgi

(D) Membrana do canal de infecção fusiona-se com a membrana celular

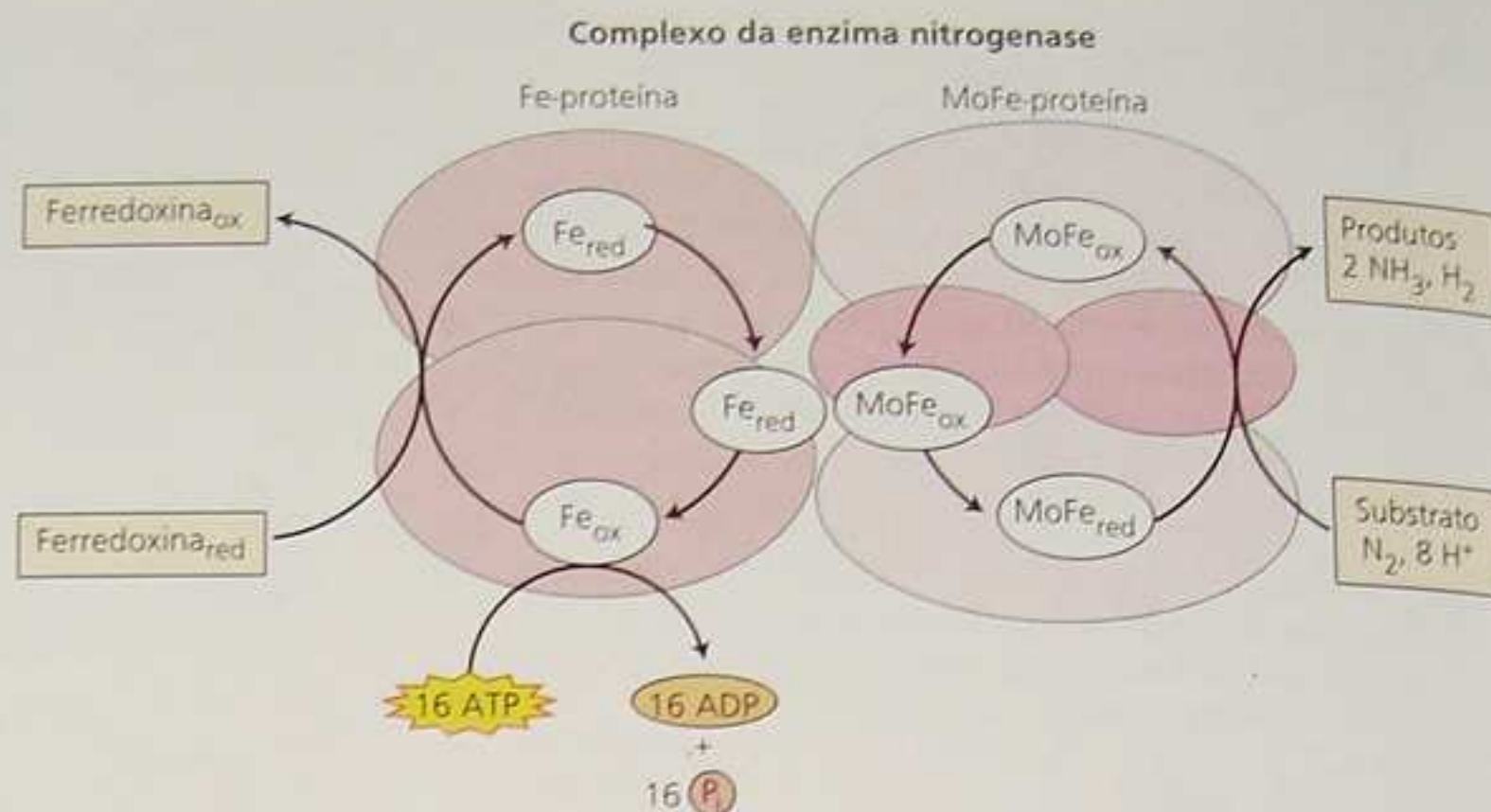
(E)

(F) Vesícula contendo rizóbios

embora, sob condições naturais, ela reaja somente com N_2 e H^+. Uma das reações catalisadas pela nitrogenase, a redução do acetileno a etileno, é usada para estimar a atividade da nitrogenase (ver **Tópico 12.2 na Internet**).

O balanço energético da fixação do nitrogênio é complexo. A produção de NH_3 a partir de N_2 e H_2 é uma reação exergônica (ver **Capítulo 2 na Internet** para uma discussão de reações exergônicas), com um $\Delta G^{0'}$ (mudança na energia livre) de –27 kJ mol^{-1}. Entretanto, a produção industrial de NH_3 a partir de N_2 e H_2 é *endergônica*, necessitando-se um grande *input* de energia, devido à energia de ativação necessária para quebrar a ligação tripla do N_2. Pela mesma razão, a redução enzimática do N_2 pela nitrogenase também requer um grande investimento de energia (ver Equação 12.9), embora as mudanças exatas na energia livre ainda sejam desconhecidas.

Cálculos baseados no metabolismo de carboidrato de leguminosas indicam que a planta consome 12 g de carbono orgânico por grama de N_2 fixado (Heytler e cols., 1984). Com base na Equação 12.9, o $\Delta G^{0'}$ para a reação geral da fixação biológica do nitrogênio é cerca de –200 kJ mol^{-1}. Visto que a reação total é altamente exergônica, a produção de amônio é limitada pela ação lenta (número de moléculas de N_2 reduzida por unidade de tempo) do complexo nitrogenase (Ludwig e de Vries, 1986).

Sob condições naturais, quantidades substanciais de H^+ são reduzidas ao gás H_2. Este processo pode competir com a redução do N_2 pelos elétrons da nitrogenase. Nos rizóbios, 30 a 60% da

FIGURA 12.12 A reação catalisada pela nitrogenase. A ferredoxina reduz a Fe-proteína. Acredita-se que a ligação e a hidrólise do ATP à Fe-proteína provoca uma mudança na conformação dessa proteína, o que facilita as reações redox. A Fe-proteína reduz a MoFe-proteína e esta última reduz o N_2 (Dixon e Wheeler, 1986 e Buchanan e cols., 2000).

energia fornecida para a nitrogenase podem ser perdidos como H_2, diminuindo a eficiência da fixação do nitrogênio. Alguns rizóbios, entretanto, contêm hidrogenase, uma enzima que pode clivar o H_2 formado e gerar elétrons para a redução do N_2, aumentando, assim, a eficiência da fixação do nitrogênio (Marschner, 1995).

Amidas e ureídas são formas transportadas de nitrogênio

Os organismos procariontes simbióticos fixadores de nitrogênio liberam amônia que, para evitar a toxicidade, deve ser rapidamente convertida em formas orgânicas nos nódulos da raiz, antes de serem transportadas pelo xilema para a parte aérea. As leguminosas fixadoras de nitrogênio podem ser divididas em exportadoras de amidas ou exportadoras de ureídas, com base na composição da seiva do xilema. As amidas (principalmente os aminoácidos asparagina ou glutamina) são exportadas por leguminosas de regiões temperadas, tais como ervilha (*Pisum*), trevo (*Trifolium*), fava (*Vicia*) e lentilha (*Lens*).

As ureídas são exportadas por leguminosas de origem tropical, tais como a soja (*Glycine*), o feijão (*Phaseolus*), o amendoim (*Arachis*) e a *Vigna*. As três ureídas principais são alantoína, ácido alantóico e citrulina (Figura 12.13). A alantoína é sintetizada nos peroxissomos a partir do ácido úrico, enquanto o ácido alantóico é sintetizado a partir da alantoína no retículo endoplasmático. O local de síntese da citrulina a partir do aminoácido ornitina não foi ainda determinado. Os três compostos são liberados no xilema e transportados para a parte aérea, onde são rapidamente catabolizados a amônio. Esse amônio entra na rota de assimilação já descrita.

TABELA 12.4
Reações catalisadas pela nitrogenase

$N_2 \rightarrow NH_3$	Fixação do nitrogênio molecular
$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$	Redução do óxido nitroso
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Redução de azida
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Redução de acetileno
$2H^+ \rightarrow H_2$	Produção de H_2
$ATP \rightarrow ADP + P_i$	Atividade hidrolítica do ATP

Fonte: Burris, 1976.

ASSIMILAÇÃO DE ENXOFRE

O enxofre está entre os elementos mais versáteis dos organismos vivos (Hell, 1997). As pontes dissulfídicas em proteínas exercem funções estruturais e reguladoras (ver Capítulo 8). O enxofre participa no transporte de elétrons por meio dos grupos ferro-enxofre (ver Capítulos 7 e 11). Os sítios catalíticos de várias enzimas e co-enzimas, tais como urease e coenzima A, contêm enxofre. Os metabólitos secundários (compostos que não estão envolvidos nas vias primárias de crescimento e de desenvolvimento) que contêm enxofre variam desde os fatores Nod rizobiais, discutidos na seção anterior, ao anti-séptico alina encontrado no alho e ao anticarcinogênico sulforafano, presente no brócolis.

A versatilidade do enxofre deriva, em parte, da propriedade que apresenta em comum com o nitrogênio: *múltiplos estados estáveis de oxidação*. Nesta seção, serão discutidas as etapas enzimáticas que participam da assimilação do enxofre e as reações bioquímicas que catalisam a redução do sulfato em dois aminoácidos contendo enxofre, cisteína e metionina.

O sulfato é a forma de absorção de enxofre nos vegetais

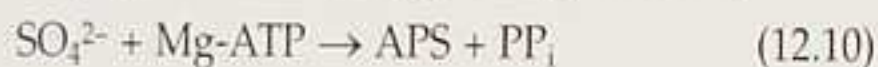
A maioria do enxofre nas células de vegetais superiores deriva do sulfato (SO_4^{-2}) absorvido via um transportador H^+-SO_4^{2-} do tipo simporte (ver Capítulo 6), a partir da solução do solo. O sulfato no solo é proveniente sobremaneira do desgaste das rochas. No entanto, a industrialização acrescenta uma fonte adicional de sulfato: a poluição atmosférica. A queima de combustíveis fósseis libera várias formas de enxofre gasoso, incluindo dióxido de enxofre (SO_2) e sulfeto de hidrogênio (H_2S), os quais são levados para o solo pela chuva.

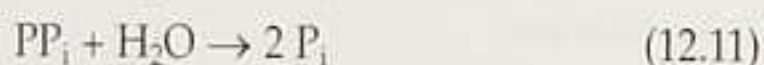
Quando dissolvido em água, o SO_2 é hidrolisado e transforma-se em ácido sulfúrico (H_2SO_4), um ácido forte, que é a principal fonte da chuva ácida. As plantas podem, também, metabolizar o dióxido de enxofre, que é absorvido na forma gasosa através dos estômatos. Entretanto, exposições prolongadas (mais de oito horas) às altas concentrações atmosféricas do SO_2 (maiores do que 0,3 ppm) causam extensos danos nos tecidos, devido à formação do ácido sulfúrico.

FIGURA 12.13 As principais ureídas utilizadas para transportar nitrogênio a partir dos locais de fixação para os locais onde serão desaminados para fornecer nitrogênio para a síntese de aminoácidos e nucleosídeos.

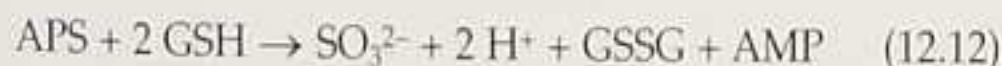
A assimilação do sulfato necessita da redução do sulfato a cisteína

A primeira etapa na síntese de compostos orgânicos contendo enxofre é a redução do sulfato ao aminoácido cisteína (Figura 12.14). O sulfato é muito estável e necessita ser ativado antes que alguma reação subseqüente possa ocorrer. A ativação inicia com a reação entre o sulfato e o ATP, para formar 5'-adenililsulfato (o qual é, algumas vezes, referido como adenosina-5'-fosfosulfato e abreviado como APS) e pirofosfato (PP_i) (ver Figura 12.14):

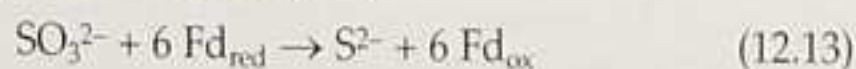
$$SO_4^{2-} + \text{Mg-ATP} \rightarrow \text{APS} + PP_i \quad (12.10)$$

A enzima que catalisa essa reação, a ATP sulfurilase, apresenta duas formas: a maior é encontrada nos plastídeos e a menor, no citoplasma (Leustek e cols., 2000). A reação de ativação é energeticamente desfavorável. Para levar essa reação adiante, os produtos APS e PP_i devem ser convertidos de imediato em outros compostos. O PP_i é hidrolisado a fosfato inorgânico (P_i) pela pirofosfatase inorgânica, de acordo com a seguinte reação:

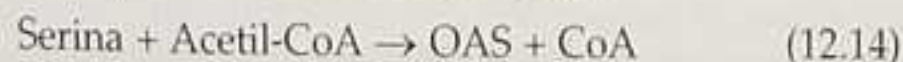
$$PP_i + H_2O \rightarrow 2\,P_i \quad (12.11)$$

O outro produto, APS, é rapidamente reduzido ou sulfatado, sendo predominante a via de redução (Leustek e cols., 2000).

A redução do APS é um processo de múltiplas etapas, que ocorre exclusivamente nos plastídeos. De início, a APS redutase, aparentemente, transfere dois elétrons da glutationa reduzida (GSH) para produzir sulfito (SO_3^{2-}):

$$\text{APS} + 2\,\text{GSH} \rightarrow SO_3^{2-} + 2\,H^+ + \text{GSSG} + \text{AMP} \quad (12.12)$$

onde GSSG representa a glutationa oxidada. (o *SH* em GSH e o *SS* em GSSG representam as pontes S-H e S-S, respectivamente).

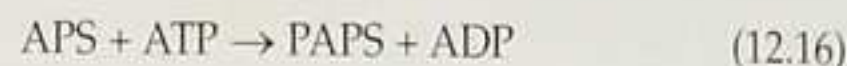
A seguir, a sulfito redutase transfere seis elétrons da ferredoxina (Fd_{red}) para produzir sulfeto (S^{2-}):

$$SO_3^{2-} + 6\,Fd_{red} \rightarrow S^{2-} + 6\,Fd_{ox} \quad (12.13)$$

O sulfeto resultante reage com *O*-acetilserina (OAS) para formar cisteína e acetato. A *O*-acetilserina, que reage com o S^{2-}, é formada na reação catalisada pela serina acetiltransferase:

$$\text{Serina} + \text{Acetil-CoA} \rightarrow \text{OAS} + \text{CoA} \quad (12.14)$$

A reação que produz cisteína e acetato é catalisada pela OAS tiol-liase:

$$\text{OAS} + S^{2-} \rightarrow \text{cisteína} + \text{acetato} \quad (12.15)$$

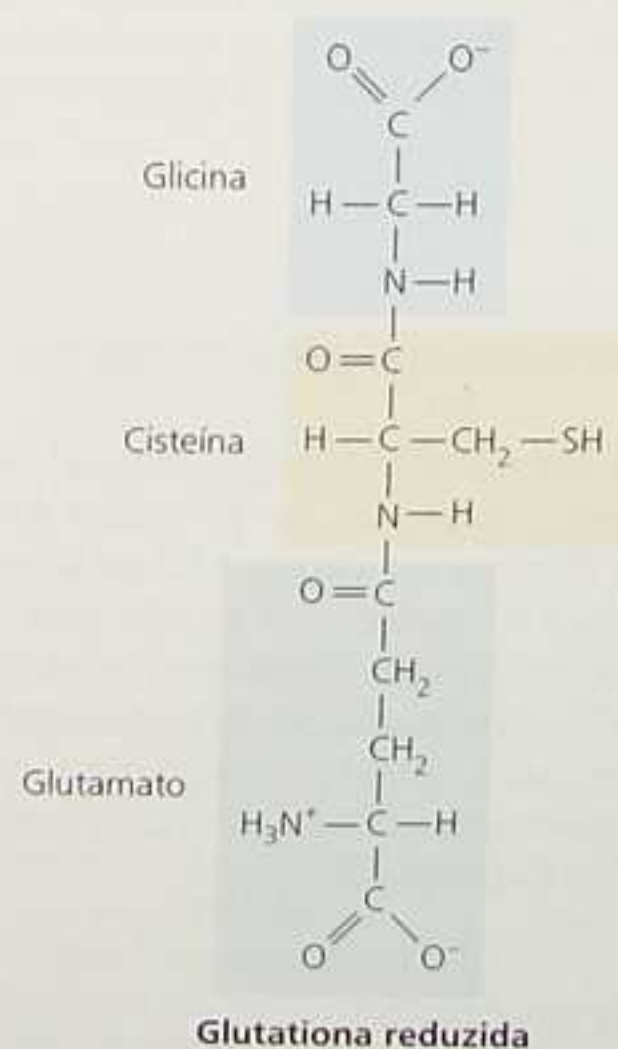
A sulfatação do APS, localizada no citosol, é a via alternativa. Inicialmente, a APS quinase catalisa a reação da APS com ATP, para formar 3'-fosfoadenosina-5'- fosfossulfato (PAPS).

$$\text{APS} + \text{ATP} \rightarrow \text{PAPS} + \text{ADP} \quad (12.16)$$

As sulfotransferases, então, podem transferir o grupo sulfato do PAPS para vários compostos, incluindo colina, brassinosteróides, flavonol, ácido gálico glicosídeo, glucosinolatos, peptídeos e polissacarídeos (Leustek e Saito, 1999).

A assimilação do sulfato ocorre principalmente nas folhas

A redução do sulfato à cisteína altera o número de oxidação do enxofre de +6 para −4, assim necessitando da transferência de 10 elétrons. A glutationa, a ferredoxina, o NAD(P)H ou a *O*-acetilserina podem atuar como doadores de elétrons em vários passos da rota metabóbica (ver Figura 12.14).

Na assimilação do enxofre, as folhas são em geral mais ativas do que as raízes, provavelmente devido ao fato da fotossíntese disponibilizar a ferredoxina reduzida e a fotorrespiração gerar a serina, que pode estimular a produção da *O*-acetilserina (ver Capítulo 8). O enxofre assimilado nas folhas é exportado pelo floema para os locais de síntese protéica (frutos e ápices caulinares e radiculares), sobretudo na forma de glutationa (Bergmann e Rennenberg, 1993):

Glutationa reduzida

A glutationa também atua como um sinal que coordena a absorção do sulfato pelas raízes e a assimilação do sulfato pela parte aérea.

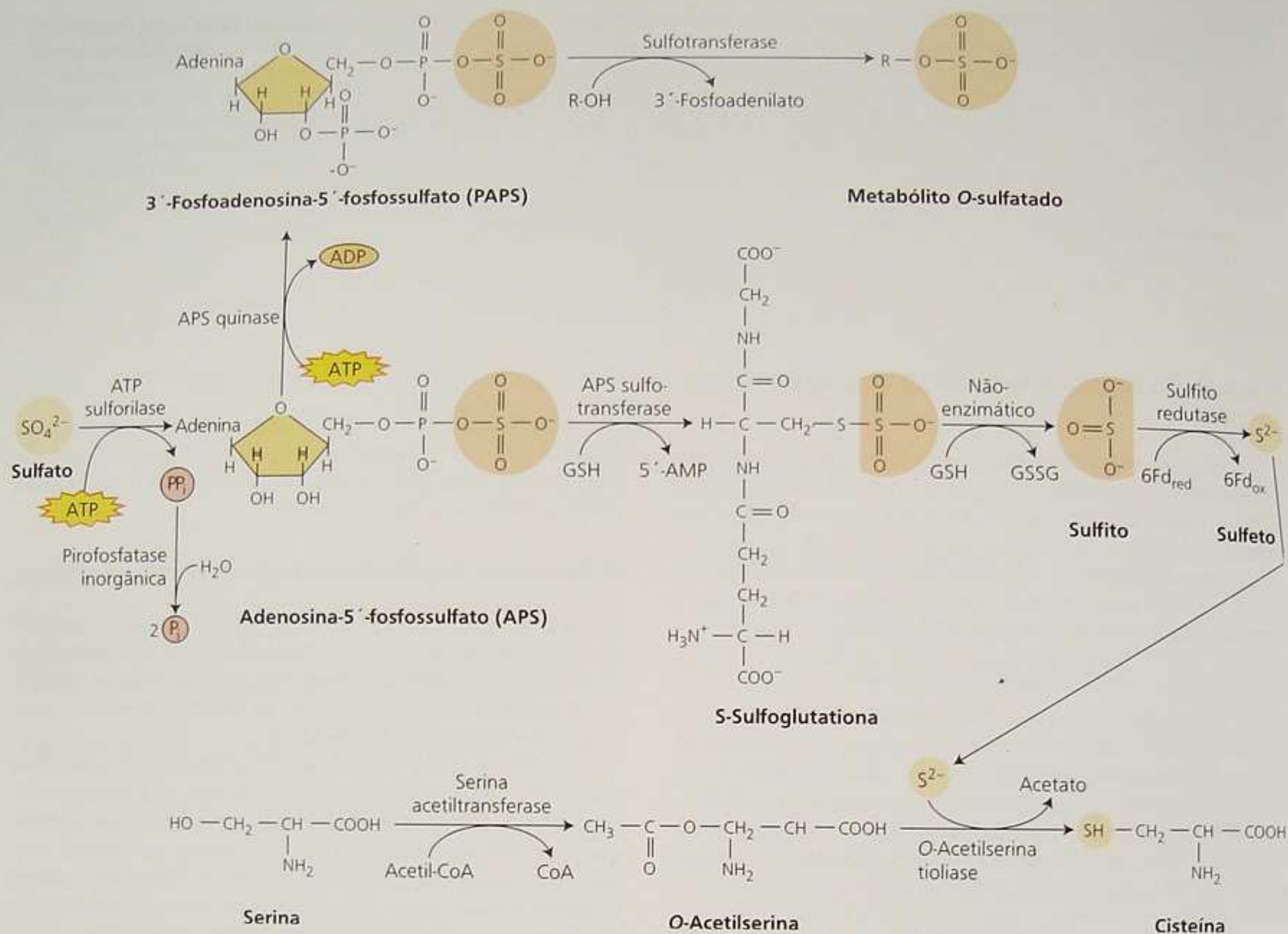



FIGURA 12.14 Estrutura e rotas metabólicas dos compostos envolvidos na assimilação do enxofre. A enzima ATP sulforilase cliva o pirofosfato do ATP e o substitui com o sulfato. O sulfeto é produzido a partir do APS por reações que envolvem a redução pela glutationa e ferredoxina. O sulfeto ou tiossulfeto reagem com a *O*-acetilserina para formar cisteína. Fd, ferredoxina; GSH, glutationa reduzida; GSSG, glutationa oxidada.

A metionina é sintetizada a partir da cisteína

A metionina, um outro aminoácido contendo enxofre encontrado nas proteínas, é sintetizada nos plastídeos a partir da cisteína (para maiores detalhes ver **Tópico 12.3 na Internet**). Após as sínteses da cisteína e da metionina, o enxofre pode ser incorporado nas proteínas e em diversos outros compostos, tais como a acetil CoA e o *S*-adenosilmetionina, sendo este último um composto muito importante para a síntese do etileno (ver Capítulo 22), e em reações envolvendo a transferências de grupos metil, como na síntese da lignina (ver Capítulo 13).

ASSIMILAÇÃO DO FOSFATO

O fosfato (HPO_4^{2-}) na solução do solo é rapidamente absorvido pelas raízes das plantas por intermédio de um transportador de H^+-HPO_4^{2-} do tipo simporte (ver Capítulo 6) e incorporado em uma variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares fosfatos, fosfolipídeos e nucleotídeos. O principal ponto de entrada do fosfato na via de assimilação ocorre durante a formação do ATP, a molécula de energia da célula. Nessa reação, o fosfato inorgânico é adicionado ao segundo grupo fosfato da adenosina difosfato para formar a ligação éster fosfato.

Na mitocôndria, a energia para a síntese do ATP é proveniente da oxidação do NADH pela fosforilação oxidativa (ver Capítulo 11). O ATP é também sintetizado segundo reações da fosforilação dependente da luz que ocorrem no cloroplasto (ver Capítulo 7). Além destas reações que ocorrem nas mitocôndrias e nos cloroplastos, aquelas que acontecem no citosol também assimilam fosfato.

A glicólise incorpora o fosfato inorgânico no ácido 1-3-difosfoglicérico, formando um grupo acil fosfato de alta energia. Este fosfato pode ser doado para o ADP para formar o ATP, em uma reação de fosforilação em nível de substrato (ver Capítulo 11). Uma vez o fosfato incorporado ao ATP, o grupo fosfato pode ser transferido por intermédio de muitas reações diferentes, para formar vá-

rios compostos fosforilados encontrados nas células dos vegetais superiores.

ASSIMILAÇÃO DE CÁTIONS

Os cátions absorvidos pelas células vegetais formam complexos com compostos orgânicos, nos quais o cátion se torna ligado ao complexo por ligações não-covalentes (para discussão de ligações não-covalentes, ver **Capítulo 2 na Internet**). As plantas assimilam macronutrientes catiônicos como potássio, magnésio e cálcio, assim como micronutrientes catiônicos — cobre, ferro, manganês, cobalto, sódio e zinco.

Nesta seção, serão descritas as ligações eletrostáticas e de valência coordenada, as quais fazem parte da assimilação de vários cátions que as plantas utilizam como nutrientes e as exigências especiais para a absorção do ferro pelas raízes e a sua subseqüente assimilação nas plantas.

Os cátions formam ligações não-covalentes com compostos de carbono

As ligações não-covalentes formadas entre os cátions e os compostos de carbono são de dois tipos: ligações de valência coordenada e ligações eletrostáticas. Na formação de um complexo de valência coordenada, vários átomos de oxigênio ou nitrogênio de um composto de carbono doam elétrons não-compartilhados para formar uma ligação com o nutriente catiônico. Como resultado, a carga positiva do cátion é neutralizada.

As *ligações de valência coordenada* formam-se tipicamente entre cátions polivalentes e moléculas de carbono — por exemplo, complexos entre o cobre e o ácido tartárico (Figura 12.15A) ou entre o magnésio e a clorofila *a* (Figura 12.15B). Os nutrientes que são assimilados como complexo de valência coordenada incluem o cobre, o zinco, o ferro e o magnésio. O cálcio também pode formar um complexo de valência coordenada com o ácido poligaracturônico das paredes celulares (Figura 12.15C).

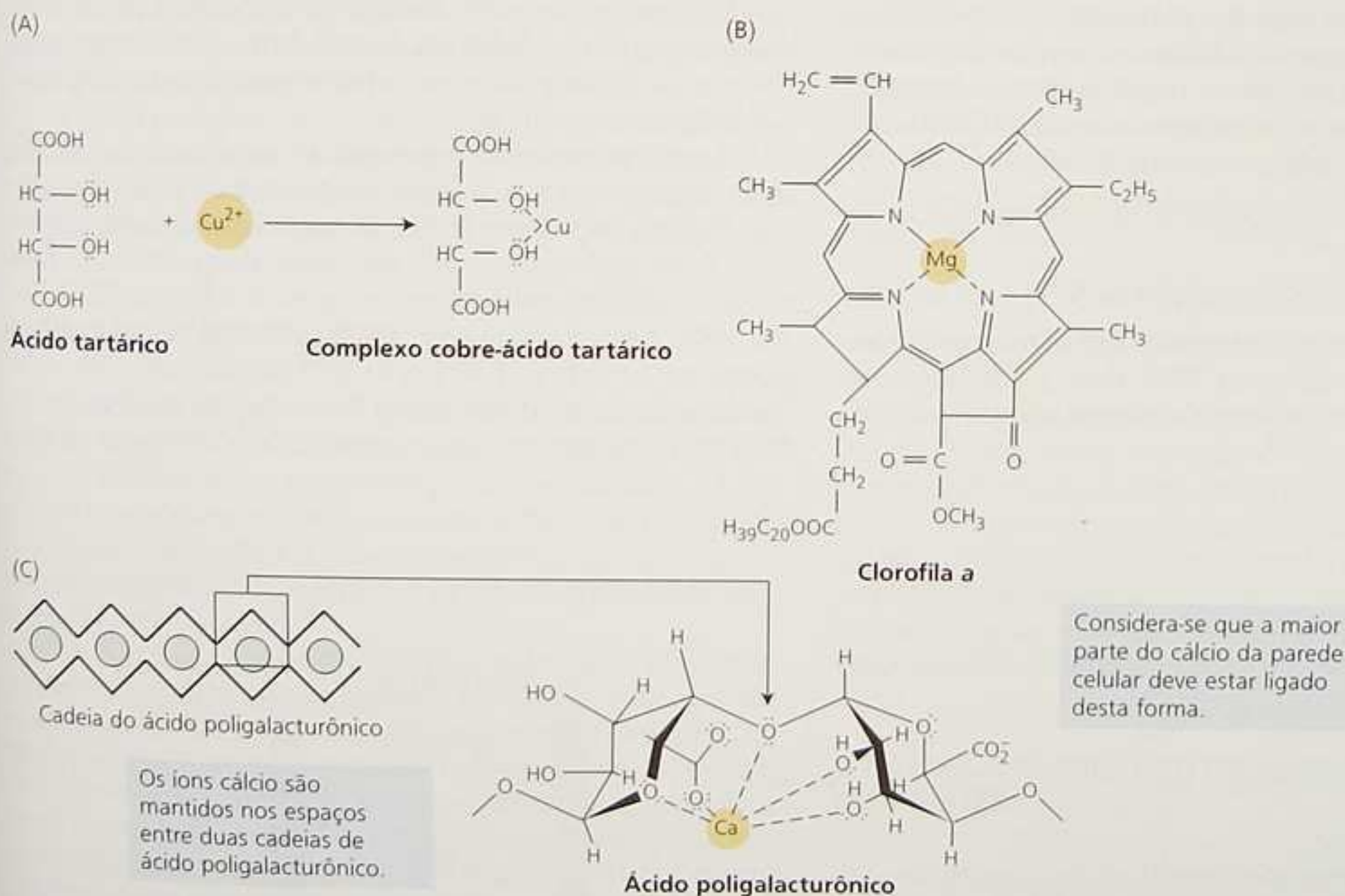



FIGURA 12.15 Exemplos de complexos de valência coordenada. Os complexos de valência coordenada são formados quando os átomos de oxigênio ou nitrogênio, do composto de carbono, doam pares de elétrons não-compartilhados (representados por pontos) para formar uma ligação com o cátion. (A) Íons cobre compartilham elétrons com os oxigênios das hidroxilas do ácido tartárico. (B) Íons magnésio compartilham elétrons com os átomos de nitrogênios da clorofila *a*. As linhas tracejadas representam as ligações de valência coordenada entre elétrons não-compartilhados dos átomos de nitrogênio e do cátion magnésio. (C) O modelo de "caixa de ovos" da interação do ácido poligalacturônico, o principal constituinte das pectinas nas paredes celulares, e os íons cálcio. Na direita está representado, de forma aumentada, a formação de um complexo de valência coordenada entre um único íon cálcio com os oxigênios das hidroxilas dos resíduos do ácido galacturônico. (Rees, 1977).

As ligações eletrostáticas são formadas devido à atração de um cátion carregado positivamente por um grupo carregado negativamente, como o carboxilato (—COO⁻) em um composto de carbono. Ao contrário da situação das ligações coordenadas, o cátion em uma ligação eletrostática mantém a sua carga positiva. Os cátions monovalentes, como o potássio (K^+), podem formar ligações eletrostáticas com os grupos carboxílicos de muitos ácidos orgânicos (Figura 12.16A). Entretanto, grande parte do potássio que é acumulado pelas células vegetais e que atua na regulação osmótica e na ativação enzimática permanece no citosol e nos vacúolos como íon livre. Os íons divalentes, como o cálcio, formam ligações eletrostáticas com os pectatos (Figura 12.16B) e os grupos carboxílicos dos ácidos poligalacturônicos (ver Capítulo 15).

Em geral, cátions como magnésio (Mg^{2+}) e o cálcio (Ca^{2+}) são assimilados pela formação de complexos de valência coordenada e ligações eletrostáticas com aminoácidos, fosfolipídeos e outras moléculas carregadas negativamente.

As raízes modificam a rizosfera para absorver o ferro

O ferro é importante nas proteínas ferro-enxofre (ver Capítulo 7) e como catalisador de enzimas que participam nas reações de redox (ver Capítulo 5), como aquelas do metabolismo do nitrogênio aqui discutidas. As plantas obtêm o ferro do solo, onde ele está presente primariamente como ferro férrico (Fe^{3+}) em óxidos como o $Fe(OH)^{2+}$, $Fe(OH)_3$ e $Fe(OH)_4^-$. Em pH neutro, o ferro férrico é altamente insolúvel. Para que quantidades suficientes do ferro sejam absorvidas da solução do solo, as raízes necessitam desenvolver vários mecanismos para aumentar a solubilidade e a disponibilidade do ferro. Tais mecanismos incluem:

- Aumento da solubilidade do ferro férrico pela acidificação do solo.
- Redução do ferro férrico a forma ferrosa (Fe^{2+}) mais solúvel.
- Liberação de compostos que formam complexos estáveis e solúveis com o ferro (Marschner, 1995). Rever o Capítulo 5, no qual esses compostos são chamados de quelantes do ferro (ver Figura 5.2).

Em geral, as raízes acidificam o solo ao seu redor. Elas exsudam prótons durante a absorção e a assimilação dos cátions, em especial amônio, e liberam compostos orgânicos, como os ácidos málico e cítrico, que aumentam a disponibilidade do ferro e do fosfato (ver Figura 5.4). A deficiência do ferro estimula a exsudação de prótons pelas raízes. Além disso, as membranas plasmáticas da raiz possuem uma enzima, a *redutase ferro-quelante*, que reduz o ferro férrico à forma ferro ferroso, onde o NADH ou o NADPH servem como doadores de elétrons. A atividade dessa enzima aumenta sob condições de deficiência de ferro.

Vários compostos secretados pelas raízes formam quelados estáveis com o ferro. Os exemplos incluem o ácido málico, o ácido cítrico, os fenólicos e o ácido piscídico. As gramíneas produzem uma classe especial de quelantes do ferro denominadas de *fitosideróforos*. Os fitosideróforos são constituídos por aminoácidos que não são encontrados nas proteínas, como o ácido muginéico, por exemplo, e formam complexos estáveis com o Fe^{3+}. As células das raízes das gramíneas possuem um sistema de transporte de fitosideróforo-Fe^{3+}, que carrega o quelado para o interior do citoplasma. Sob deficiência de ferro, as raízes das gramíneas liberam mais fitosideróforos no solo e aumentam a capacidade do sistema de transporte do fitosideróforo-Fe^{3+}.

O ferro forma complexos com o carbono e com o fosfato

Uma vez que as raízes tenham absorvido ferro ou um ferro quelado, eles são oxidados nas raízes à forma férrica e translocados, em sua maior parte, para as folhas, na forma de complexos eletrostáticos com o citrato.

A maior parte do ferro nos vegetais é encontrada na molécula heme do citocromo, nos cloroplastos e nas mitocôndrias (ver Capítulo 7). Uma importante reação de assimilação do ferro é a sua inserção na porfirina, a qual é precursora do grupo heme. Essa reação é catalisada pela enzima ferroquelatase (Figura 12.17) (Jones 1983). Além disso, as proteínas ferro-enxofre da cadeia transportadora de elétrons (ver Capítulo 7) contêm ferro não-heme covalentemente ligado aos átomos de enxofre dos resíduos de cisteína na apoproteína. O ferro é encontrado também nos centros

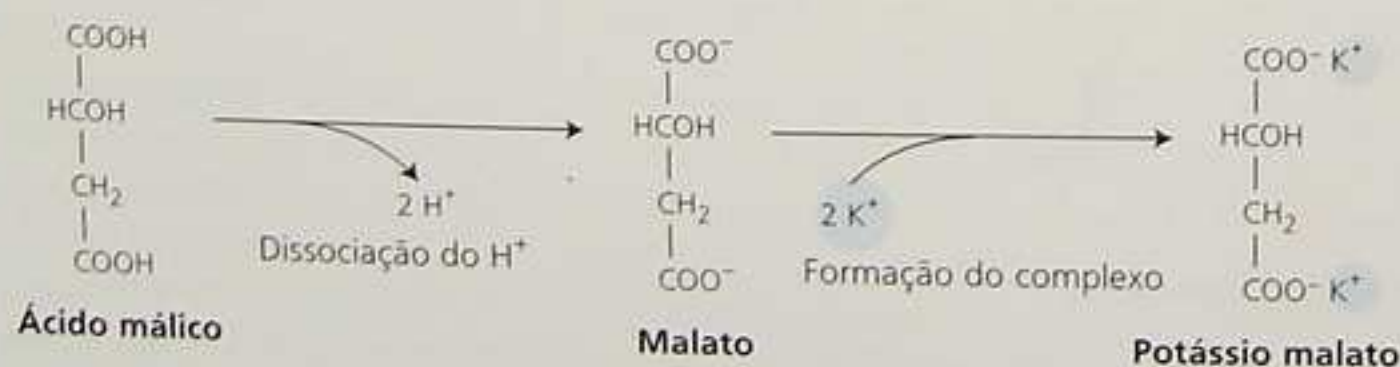
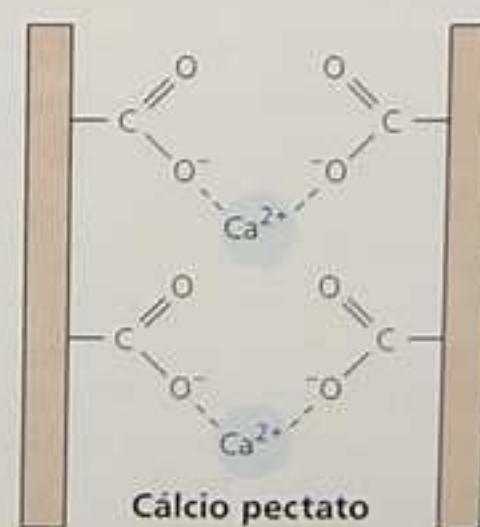



FIGURA 12.16 Exemplos de complexos eletrostáticos (iônicos). (A) O cátion K^+ monovalente e o malato formam o complexo potássio malato. (B) O cátion divalente Ca^{2+} e o pectato formam o complexo cálcio pectato. Os cátions divalentes podem formar ligações cruzadas entre as bordas paralelas que possuem grupos carboxila negativamente carregados. As ligações cruzadas do cálcio exercem um papel estrutural nas paredes celulares.

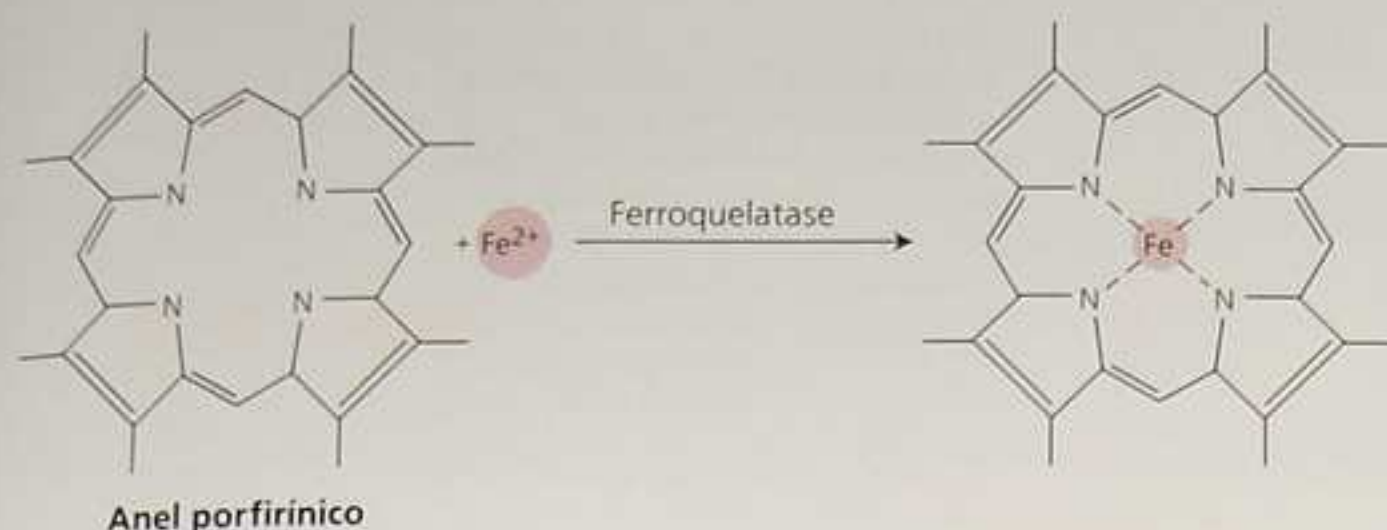



FIGURA 12.17 Reação da ferroquelatase. A enzima ferroquelatase catalisa a inserção do ferro no anel da porfirina para formar o complexo de valência coordenada. Ver a Figura 7.37 para ilustração da biossíntese do anel da porfirina.

Fe_2S_2, os quais possuem dois ferros (cada um complexado com os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína) e dois sulfetos inorgânicos.

O ferro livre (ferro que não está complexado com compostos de carbono) pode interagir com o oxigênio para formar ânions superóxidos (O_2^-), os quais podem danificar membranas pela degradação dos componentes lipídicos insaturados. As células vegetais podem limitar os danos armazenando o excesso de ferro em complexos de ferro-proteína chamados de **fitoferritina** (Bienfait e Van der Mark, 1983). A fitoferritina consiste de uma estrutura protéica com 24 subunidades idênticas formando uma esfera oca que possui uma massa molecular de cerca de 480 kDa. No interior dessa esfera, há um núcleo de 5.400 a 6.200 átomos de ferro presentes como um complexo fosfato-óxido férrico.

A forma pela qual o ferro é liberado da fitoferritina não é conhecida, porém a quebra da estrutura protéica parece estar envolvida neste processo. O nível de ferro livre nas células vegetais regula a biossíntese *de novo* da fitoferritina (Lobreaux e cols., 1992).

ASSIMILAÇÃO DO OXIGÊNIO

A respiração responde por aproximadamente de 90% do volume de oxigênio (O_2) assimilado pelas células vegetais (ver Capítulo 11). Uma outra rota importante para a assimilação do O_2 em compostos orgânicos envolve a incorporação do O_2 a partir da água (ver reação 1 da Tabela 8.1). Uma pequena proporção do oxigênio pode ser diretamente assimilada em compostos orgânicos no processo de *fixação de oxigênio*.

Na fixação de oxigênio, o oxigênio molecular é adicionado diretamente a um composto orgânico em reações realizadas por enzimas conhecidas como *oxigenases*. Lembre-se do Capítulo 8, no qual o oxigênio é diretamente incorporado em um composto orgânico durante a fotorrespiração, em uma reação que envolve a atividade oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (rubisco), a enzima de fixação do CO_2 (Ogren, 1984). O primeiro produto estável que contém oxigênio a partir da forma molecular é o 2-fosfoglicolato.

Em geral, as oxigenases são classificadas como dioxigenases ou monoxigenases, conforme o número de átomos de oxigênio que são transferidos a um composto de carbono na reação catalizada. Nas reações de **dioxigenases,** ambos os átomos de oxigênio são incorporados em um ou dois compostos de carbono (Figuras 12.18A e B). Os exemplos de dioxigenases nas células vegetais são as lipoxigenases, que catalisam a adição de dois átomos de oxigênio aos ácidos graxos insaturados (ver Figura 12.18A) e a prolil hidroxilase, a enzima que converte prolina ao aminoácido pouco comum hidroxiprolina (ver Figura 12.18B).

A hidroxiprolina é um importante componente da extensina, uma proteína da parede celular (ver Capítulo 15). A síntese da hidroxiprolina, a partir da prolina, difere da síntese de todos os outros aminoácidos, pois a reação ocorre após a prolina ter sido incorporada na proteína e é, portanto, uma reação de modificação pós-traducional. A prolil hidroxilase esta localizada no retículo endoplasmático, sugerindo que a maior parte das proteínas contendo hidroxiprolina é encontrada na via secretora.

As **monoxigenases** adicionam um dos átomos do oxigênio molecular a um composto de carbono; o outro átomo de oxigênio é convertido em água. As monoxigenases são algumas vezes referidas como *oxidases de função mista* devido à sua capacidade de catalisar simultaneamente a reação de oxigenação e a reação oxidase (redução do oxigênio a água). A reação monoxigenase também necessita de um substrato reduzido (NADH ou NADPH) como um doador de elétrons, de acordo com a seguinte equação:

$$A + O_2 + BH_2 \rightarrow AO + H_2O + B$$

onde A representa o composto orgânico e B representa o doador de elétrons.

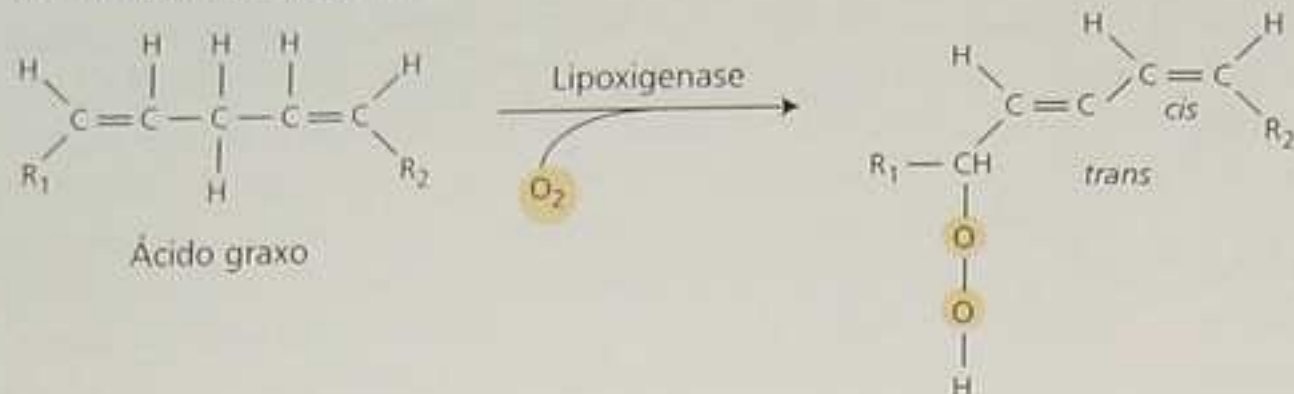
Uma importante monoxigenase vegetal é a família das heme-proteínas, coletivamente chamadas de citocromo P450, as quais catalisam a hidroxilação do ácido cinâmico em ácido *p*-cumárico (Figura 12.18C). Nas monoxigenases, o oxigênio é primeiramente ativado por ser combinado com o átomo de ferro do grupo heme; o NADPH serve como um doador de elétrons. O sistema oxidase de função mista está localizado no retículo endoplasmático e é capaz de oxidar vários substratos, incluindo mono e diterpenos e ácidos graxos.

O BALANÇO ENERGÉTICO DA ASSIMILAÇÃO DE NUTRIENTES

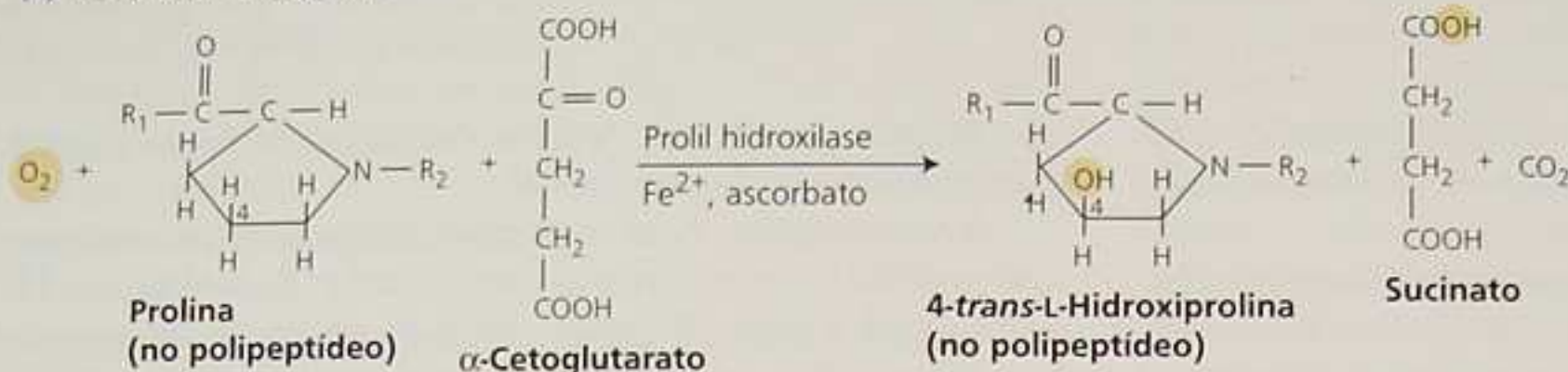
A assimilação de nutrientes geralmente necessita de grandes quantidades de energia para converter compostos inorgânicos estáveis de baixa energia em compostos orgânicos de alta energia. Por exemplo, a redução do nitrato a nitrito e este em amônio requer a transferência de cerca de 10 elétrons e responde por cerca de 25% do total de energia consumida pelas raízes e partes aéreas (Bloom, 1997). Conseqüentemente, o vegetal pode utilizar um quarto da sua energia para assimilar o nitrogênio, um constituinte que representa menos de 2% do peso seco total da planta.

Muitas das reações de assimilação ocorrem no estroma do cloroplasto, onde elas têm acesso imediato a poderosos agentes redu-

(A) Reação da dioxigenase

Ácido graxo — Lipoxigenase, O_2 → (*cis*, *trans*)

A dioxigenase lipoxigenase catalisa a adição de dois átomos de oxigênio ao ácido graxo conjugado para formar um hidroperóxido com um par de ligações duplas conjugadas *cis–trans*. O ácido graxo hidróxi-peróxi pode então ser enzimaticamente convertido a ácidos graxos hidróxi e outros metabólitos.

(B) Reação da dioxigenase

O_2 + **Prolina (no polipeptídeo)** + **α-Cetoglutarato** — Prolil hidroxilase, Fe^{2+}, ascorbato → **4-*trans*-L-Hidroxiprolina (no polipeptídeo)** + **Sucinato** + CO_2

A dioxigenase prolil hidroxilase catalisa a adição de um oxigênio do O_2 na prolina da cadeia polipeptídica para produzir hidroxiprolina, e a adição de um oxigênio ao α-cetoglutarato para produzir succinato e CO_2.

(C) Reação da monoxigenase

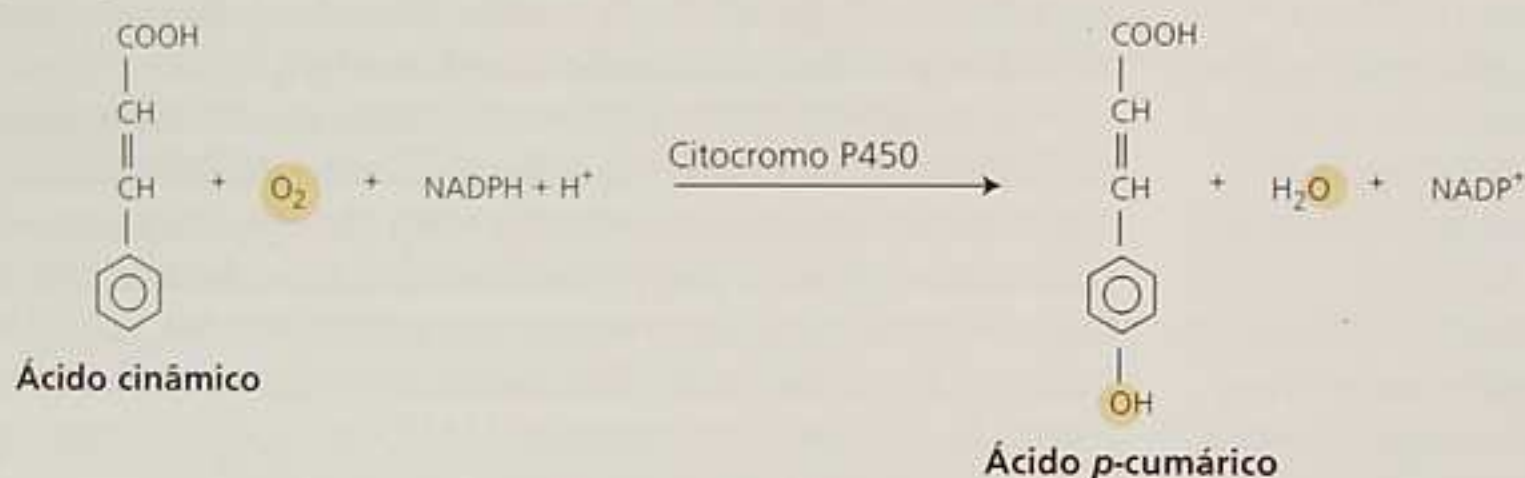
Ácido cinâmico + O_2 + NADPH + H^+ — Citocromo P450 → **Ácido *p*-cumárico** + H_2O + $NADP^+$

A monoxigenase citocromo P450 utiliza um oxigênio do O_2 para hidroxilar o ácido cinâmico (e outros substratos) e o outro oxigênio para produzir água. O NAD(P)H atua como um doador de elétrons para as reações de monoxigenase.

FIGURA 12.18 Exemplos de dois tipos de reações da oxigenase em células de vegetais superiores.

tores como o NADPH, a tioredoxina e a ferredoxina formados durante o transporte de elétrons da fotossíntese. Esse processo — combinando à assimilação de nutrientes ao transporte de elétrons da fotossíntese — é denominado **fotoassimilação** (Figura 12.19).

A fotoassimilação e o ciclo de Calvin ocorrem no mesmo compartimento, mas a fotoassimilação só ocorre quando a cadeia fotossintética de transporte de elétrons produz agentes redutores além do que é necessário para o ciclo de Calvin (p. ex., sob condições de alta luminosidade e baixo CO_2) (Robinson, 1988). Altos níveis de CO_2 inibem a fotoassimilação (Figura 12.20, ver **Ensaio 12.1 na Internet**). Como resultado, as plantas C_4 (ver Capítulo 8) direcionam a maior parte da sua fotoassimilação nas células do mesofilo, onde as concentrações do CO_2 são baixas (Becker e cols., 1993).

Os mecanismos que regulam a partição dos agentes redutores entre o ciclo de Calvin e a fotoassimilação demandam maiores investigações, pois é esperado que os níveis atmosféricos de CO_2 sejam duplicados durante o próximo século (ver Capítulo 9), de forma que este fenômeno pode afetar as relações planta-nutriente.

RESUMO

A assimilação de nutrientes é o processo pelo qual os nutrientes obtidos pelas plantas são incorporados em compostos de carbono necessários ao crescimento e ao desenvolvimento. Com freqüência, esses processos envolvem reações químicas altamente energéticas e, assim, podem depender diretamente dos agentes redutores produzidos pela fotossíntese.

A assimilação do nitrogênio é uma das várias etapas que constituem o ciclo do nitrogênio, o qual engloba várias formas do nitrogênio da biosfera e suas interconversões. As principais fontes de nitrogênio disponíveis para as plantas são o nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4).

O nitrato absorvido pelas raízes é assimilado nas raízes ou nas partes aéreas, dependendo da sua disponibilidade e da espécie vegetal. No processo de assimilação, o nitrato é reduzido a nitrito (NO_2^-) no citosol pela enzima nitrato redutase; posteriormente, o nitrito é reduzido a amônio nos plastídeos da raiz ou nos cloroplastos pela enzima nitrito redutase.

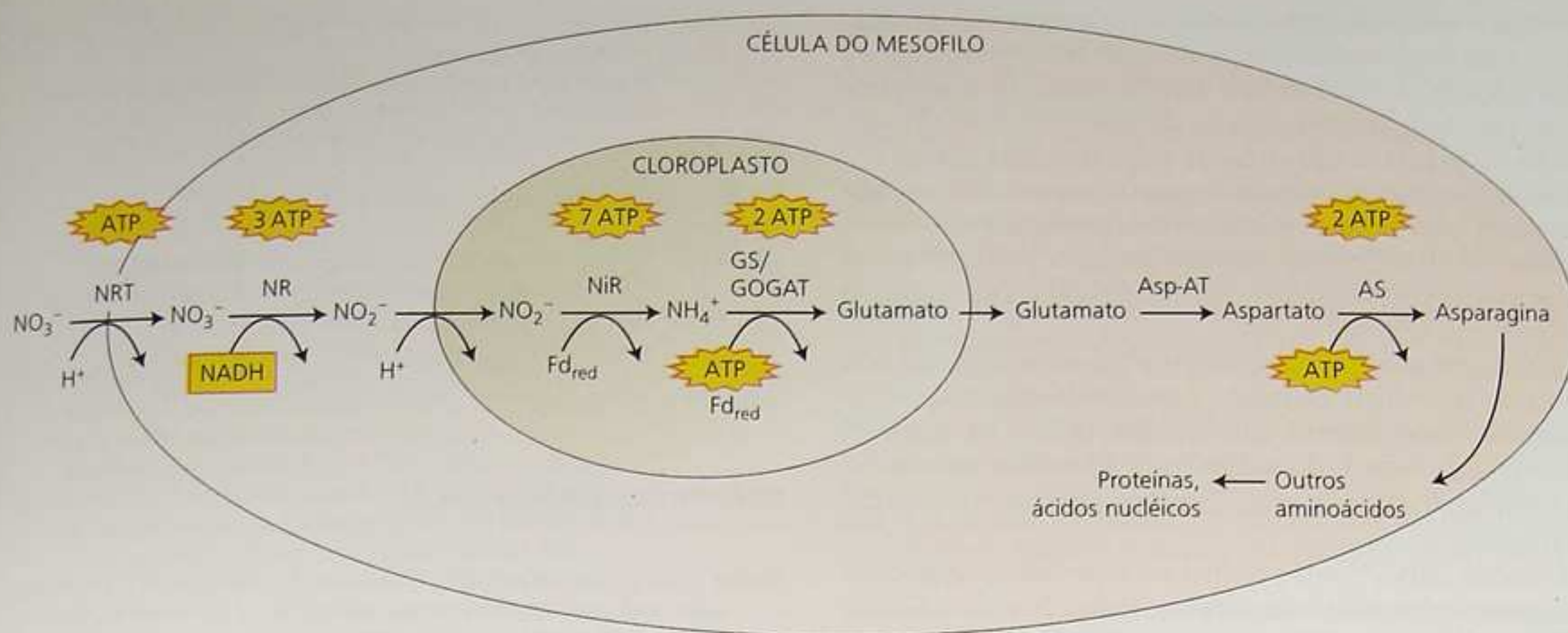



FIGURA 12.19 Resumo dos processos envolvidos na assimilação do nitrogênio mineral na folha. O nitrato translocado das raízes pelo xilema é absorvido por uma célula do mesofilo através de um dos simportes nitrato-próton (NRT) para o citoplasma. O nitrato é, então, reduzido a nitrito via nitrato redutase (NR). O nitrito é translocado para o estroma do cloroplasto junto com um próton. No estroma, o nitrito é reduzido à amônio, via nitrito redutase (NiR) e esse amônio é convertido em glutamato pela ação seqüencial da glutamina sintetase (GS) e da glutamato sintase (GOGAT). Novamente no citoplasma, o glutamato é transaminado a aspartato, via aspartato aminotransferase (Asp-AT). Finalmente, a asparagina sintetase (AS) converte o aspartato em asparagina. As quantidades aproximadas de ATP equivalente para cada reação estão indicadas acima.

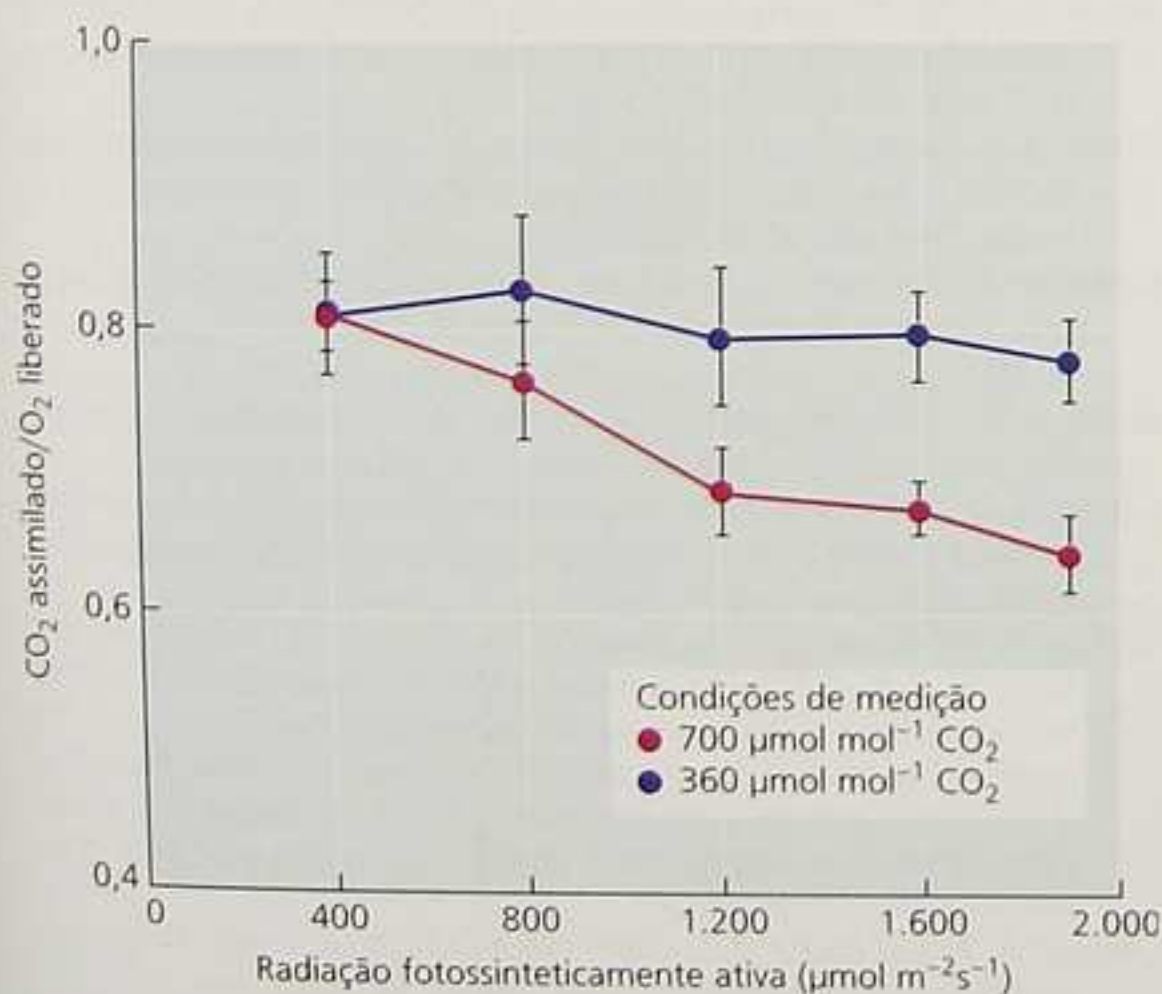



FIGURA 12.20 Quociente de assimilação (QA= CO_2 assimilado/O_2 liberado) de plântulas de trigo como uma função da quantidade de luz (radiação fotossinteticamente ativa). A fotoassimilação do nitrato está diretamente relacionada com o quociente de assimilação, pois a transferência de elétrons para o nitrato e nitrito durante a fotoassimilação aumenta a liberação de O_2 a partir das reações fotossintéticas dependentes de luz, enquanto a assimilação de CO_2 pelas reações independentes da luz continua em taxas similares. Entretanto, plantas que estão fotoassimilando o nitrato exibem um QA menor. Nas medidas realizadas no ambiente, em concentrações de 360 μmol mol^{-1} CO_2 (linha vermelha), o QA diminui como uma função da radiação incidente, indicando que as taxas de fotoassimilação aumentaram. Em concentrações elevadas (700 μmol mol^{-1} CO_2, linha azul), o QA permanece constante em todos os níveis de luz utilizados, indicando que as reações de fixação do CO_2 estão competindo por agentes redutores, inibindo a fotoassimilação (Bloom e cols., 2002).

O amônio, derivado da absorção da raiz ou produzido por assimilação do nitrato ou da fotorrespiração, é convertido a glutamina e glutamato pelas ações seqüenciais da glutamina sintetase e da glutamato sintase, as quais estão localizadas no citosol e nos plastídeos das raízes ou dos cloroplastos.

Uma vez assimilado em glutamina ou glutamato, o nitrogênio pode ser transferido para muitos outros compostos orgânicos através de diversas reações, incluindo as de transaminação. A interconversão entre a glutamina e a asparagina pela asparagina sintetase equilibra o metabolismo do carbono e do nitrogênio em uma planta.

Muitas plantas formam uma relação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio que contêm um complexo enzimático, a nitrogenase, que pode reduzir o nitrogênio atmosférico em amônia. Plantas leguminosas e actinorrízicas formam associações com

rizóbios e *Frankia*, respectivamente. Tais associações são o resultado de uma excelente sintonia na interação entre o simbionte e a planta hospedeira, envolvendo o reconhecimento de sinais específicos, a indução de um programa de desenvolvimento especializado na planta, a absorção de bactérias pela planta e o desenvolvimento de nódulos, os únicos órgãos que abrigam bactérias nas células vegetais. Alguns microrganismos procariontes fixadores de nitrogênio não formam relações simbiontes com plantas superiores, porém beneficiam as plantas pelo aumento dos níveis de nitrogênio do solo.

Semelhante ao nitrato, o sulfato (SO_4^{2-}) deve ser reduzido pela assimilação. Na redução do sulfato, é produzida uma forma ativada do sulfato, denominada 5'-adenililsulfato (APS). O sulfeto (S^{2-}), produto final da redução do sulfato, não é acumulado nas células, mas, ao contrário, é rapidamente incorporado nos aminoácidos cisteína e metionina.

O fosfato (HPO_4^{2-}) está presente em uma variedade de compostos encontrados nas células vegetais, incluindo açúcares fosfatos, lipídeos, ácidos nucléicos e nucleotídeos livres. O produto inicial da sua assimilação é o ATP, o qual é produzido por fosforilações em nível de substrato no citosol, na fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e na fosforilação nos cloroplastos.

Enquanto a assimilação do nitrogênio, do enxofre e do fósforo necessita da formação de ligações covalentes com compostos de carbono, muitos macro e micronutrientes catiônicos (p. ex. K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Na^{2+}, Zn^{2+}) simplesmente formam complexos. Esses complexos podem ser mantidos por ligações eletrostáticas ou por ligações de valência coordenada.

A assimilação do ferro pode envolver a quelação, as reações de oxidorredução e a formação de complexos. A fim de armazenar grandes quantidades de ferro, as células vegetais sintetizam fitoferritina, uma proteína que armazena o ferro. Uma importante função do ferro nas células vegetais é agir como um componente redox no sítio ativo de enzimas, freqüentemente como um complexo ferro-porfirina. O ferro é inserido em um grupo porfirínico na reação da ferroquelatase.

Além de ser utilizado na respiração, o oxigênio molecular pode ser assimilado no processo de fixação de oxigênio, no qual ocorre a adição direta de oxigênio aos compostos orgânicos. Tal processo é catalisado por enzimas conhecidas como oxigenases, classificadas como monoxigenases ou dioxigenases.

A assimilação de nutrientes necessita de grandes quantidades de energia para converter compostos inorgânicos estáveis de baixa energia em compostos orgânicos com alta energia. Uma planta pode utilizar um quarto de sua energia para assimilar o nitrogênio. Os vegetais utilizam a energia da fotossíntese para assimilar compostos inorgânicos no processo denominado fotoassimilação.

Material da Internet

Tópicos da Internet

12.1 Desenvolvimento de nódulos na raiz
Os primórdios dos nódulos são formados na região oposta aos pólos do protoxilema do feixe vascular da raiz.

12.2 Medição da fixação de nitrogênio
A redução do acetileno é utilizada como uma medida indireta da redução do nitrogênio.

12.3 A síntese de metionina
A metionina é sintetizada nos plastídeos a partir da cisteína.

Ensaio da Internet

12.1 O CO_2 elevado e a fotoassimilação do nitrogênio
Nas folhas que se desenvolvem sob altas concentrações de CO_2, o gás carbônico inibe a fotoassimilação do nitrogênio, pois compete pelos agentes redutores.

Referências bibliográficas

Becker, T W., Perrot-Rechenmann, C., Suzuki, A., and Hirel, B. (1993) Súbcelular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. *Planta* 191: 129-136.

Bergmann, L., and Rennenberg, H. (1993) Glutathione metabolism in plants. In *Sufiir Nutrition and Assimilation in Higher Plants. Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects*, L. J. De Kok, 1. Stulen, H. Rennenberg, C. Brunold, and W E. Rauser, eds., SPB Acad. Pub., The Hague, Netherlands, pp. 109-123.

Bienfait, H. E, and Van der Mark, E. (1983) Phytoferritin and its role in iron metabolism. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*, D. A. Robb and W S. Pierpoint, eds., Academic Press, New York, pp. 111-123.

Bloom, A. J. (1997) Nitrogen as a limiting factor: Crop acquisition of ammonium and nitrate. In *Ecology in Agriculture*, L. E. Jackson, ed., Academic Press, San Diego, CA, pp. 145-172.

Bloom, A. J., Smart, D. R., Nguyen, D. T., and Searles, P S. (2002) Nitrogen assimilation and growth of wheat under elevated carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1730-1735.

Bloom, A. J., Sukrapanna, S. S., and Warner, R. L. (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol.* 99:1294-1301.

Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R., eds. (2000) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, MD.

Burris, R. H. (1976) Nitrogen fixation. In *Plant Biochemistry*, 3rd ed., J. Bonner and J. Varner, eds., Academic Press, New York, pp. 887-908.

Campbell, W. H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:277-303.

Carlson, R. W., Forsberg, L. S., Price, N. P J., Bhat, U. R., Kelly, T. M., and Raetz, C. R. H. (1995) The structure and biosynthesis of *Rhizobium leguminosarum* lipid A. In *Progress in Clinical and Biological Research*, Vol. 392: *Bacterial Endotoxins: Lipopolysaccharides from Genes to Therapy: Proceedings of the Third Conference of the International Endotoxin Society*, held in Helsinki, Finland, on August 15-18, 1994, J. Levin et al., eds., John Wiley and Sons, New York, pp. 2-31.

Denison, R. F., and Harter, B. L. (1995) Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin. *Plant Physiol.* 107: 1355-1364.

Dixon, R. O. D., and Wheeler, C. T. (1986) *Nitrogen Fixation in Plants*. Chapman and Hall, New York.

Dong, Z., Canny M. J., McCully, M. E., Roboredo, M. R., Cabadilla, C. F., Ortega, E., and Rodes, R. (1994) A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems: A new role for the apoplast. *Plant Physiol.* 105: 1139-1147.

Etzler, M. E., Kalsi, G., Ewing, N. N., Roberts, N. J., Day, R. B., and Murphy, J. B. (1999) A nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 58565861.

FAOSTAT. (2001) *Agricultural Data*. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.

Heidstra, R., and Bisseling, T. (1996) Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor perception. *New Phytol.* 133: 25-13.

Hell, R. (1997) Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* 202: 138-148.

Heyder, P G., Reddy, G. S., and Hardy, R. W F. (1984) *In vivo* energetics of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. In *Nitrogen Fixation and COZ Metabolism*, P W. Ludden and I. E. Burris, eds., Elsevier, New York, pp. 283-292.

Jones, O. T. G. (1983) Ferrochelatase. In *Metals and Micronutrients: Uptake and Utilization by Plants*, D. A. Robb and W. S. Pierpoint, eds., Academic Press, New York, pp. 125-144.

Kaiser, W. M., Weiner, H., and Huber, S. C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* 105: 385-390.

Kleinhofs, A., Warner, R. L., Lawrence, J. M., Melzer, J. M., Jeter, J. M., and Kudrna, D. A. (1989) Molecular genetics of nitrate reductase in barley. In *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, J. L. Wray and J. R. Kinghorn, eds., Oxford *Science*, New York, pp. 197-211.

Kuzma, M. M., Hunt, S., and Layzell, D. B. (1993) Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiol. 101:* 161-169.

Lam, H.-M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., and Coruzzi, G. M. (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol. Biol.* 47: 569-593.

Lazarowitz, S. G., and Bisseling, T. (1997) Plant development from the cellular perspective: Integrating the signals (Cellular Integration of Signaling Pathways in Plant Development, Acquafredda de Maratea, Italy, May 20-30,1997). *Plant Cell* 9:1884-1900.

Lea, P. J., Blackwell, R. D., and Joy, K. W. (1992) Ammonia assimilation in higher plants. In *Nitrogen Metabolism of Plants* (Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 33), K. Mengel and D. J. Pilbeam, eds., Clarendon, Oxford, pp.153-186.

Leustek, T., and Saito, K. (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.* 120: 637-643.

Leustek, T., Martin, M. N., Bick, J.-A., and Davies, J. P. (2000) Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 141-165.

Lobreaux, S., Massenet, O., and Briat, J. -F. (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19:563-575.

Ludwig, R. A., and de Vries, G. E. (1986) Biochemical physiology of *Rhizobium* dinitrogen fixation. In *Nitrogen Fixation*, Vol. 4: *Molecular Biology*, W. I. Broughton and S. Puhler, eds., Clarendon, Oxford, pp. 50-69.

Marschner, H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd ed. Academic Press, London.

Mendel, R. R., and Stallmeyer, B. (1995) Molybdenum cofactor (nitrate reductase) biosynthesis in plants: First molecular analysis. In *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Vol. 22: *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology: Proceedings of the VIIIth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture, Florence, Italy*, 12-17 June, 1994, M. Terzi, R. Cella and A. Falavigna, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 577-582.

Mylona, P, Pawlowski, K., and Bisseling, T. (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 7: 869-885.

Oaks, A. (1994) Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. *Can. J. Bot.* 72: 739-750.

Ogren, W. L. (1984) Photorespiration: Pathways, regulation, and modification. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 415-142.

Pate, J. S. (1983) Patterns of nitrogen metabolism in higher plants and their ecological significance. In *Nitrogen as an Ecological Factor: The 22nd Symposium of the British Ecological Society, Oxford* 1981, J. A. Lee, S. McNeill, and I. H. Rorison, eds., Blackwell, Boston, pp. 225-255.

Pate, J. S., and Layzell, D. B. (1990) Energetics and biological costs of nitrogen assimilation. In *The Biochemistry of Plants*, Vol. 16: *Intermediary Nitrogen Metabolism*, B. J. Miflin and P J. Lea, eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 1-12.

Phillips, D. A., and Kapulnik, Y (1995) Plant isoflavonoids, pathogens and symbionts. *Trends Microbiol.* 3: 58-64.

Rees, D. A. (1977) *Polysaccharide Shapes.* Chapman and Hall, London.

Reis, V. M., Baldani, J. I., Baldani, V L. D., and Dobereiner, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in Gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.* 19: 227-247.

Robinson, J. M. (1988) Spinach leaf chloroplast carbon dioxide and nitrite photoassimilations do not compete for photogenerated reductant: Manipulation of reductant levels by quantum flux density titrations. *Plant Physiol.* 88: 1373-1380.

Rolfe, B. G., and Gresshoff, P. M. (1988) Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 297-320.

Schlesinger, W. H. (1997) *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, CA.

Siegel, L. M., and Wilkerson, J. Q. (1989) Structure and function of spinach ferredoxin-nitrite reductase. In *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation*, J. L. Wray and J. R. Kinghorn, eds., Oxford Science, Oxford, pp. 263-283.

Sivasankar, S., and Oaks, A. (1996) Nitrate assimilation in higher plants-The effect of metabolites and light. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 609-620.

Stokkermans, T. J. W., Ikeshita, S., Cohn, J., Carlson, R. W, Stacey, G., Ogawa, T., and Peters, N. K. (1995) Structural requirements of synthetic and natural product lipo-chitin oligosaccharides for induction of nodule primordia on *Glycine soja. Plant Physiol.* 108: 1587-1595.

Timmers, A. C. J., Auriac, M. -C., and Truchet, G. (1999) Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium-Medicago: Interaction in relation with microtubular cytoskeleton rearrangements. *Development* 126: 3617-3628.

Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. (1995) Review: Genetics of the Azospirillum-plant root association. Crit. *Rev.* Plant Sci. 14: 445-466.

van Rhijn, P, Goldberg, R. B., and Hirsch, A. M. (1998) Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* 10: 1233-1249.

Warner, R. L., and Kleinhofs, A. (1992) Genetics and molecular biology of nitrate metabolism in higher plants. *Physiol. Plant.* 85: 245-252.

Wray, J. L. (1993) Molecular biology, genetics and regulation of nitrite reduction in higher plants. *Physiol. Plant.* 89: 607-612.

Capítulo

13 Metabólitos secundários e defesa vegetal

EM HABITATS NATURAIS, os vegetais estão cercados por um grande número de inimigos potenciais. Praticamente todos os ecossistemas possuem uma significativa variedade de bactérias, vírus, fungos, nematóides, ácaros, insetos, mamíferos e outros animais herbívoros. Pela sua natureza, as plantas não conseguem evitar esses herbívoros e patógenos simplesmente deslocando-se; elas devem dispor de outras formas de proteção.

A cúticula (camada externa cerosa) e a periderme (tecido protetor secundário), além de reduzirem a perda de água, formam uma barreira à entrada de fungos e bactérias. Além disso, um grupo de compostos vegetais, conhecido como metabólitos secundários, defende os vegetais contra vários herbívoros e microrganismos patogênicos. Os compostos secundários podem também apresentar outras funções importantes, como suporte estrutural, no caso da lignina, ou pigmentos, como as antocianinas.

Neste capítulo, serão discutidos alguns dos mecanismos pelos quais os vegetais se protegem contra a herbivoria e os organismos patogênicos. No início serão discutidas as três classes de compostos que conferem proteção à superfície da planta: cutina, suberina e ceras. Em seguida, serão descritas as estruturas e as rotas biossintéticas para as três principais classes de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. Por fim, as respostas específicas dos vegetais ao ataque de patógenos, o controle genético da interação hospedeiro-patógeno e os processos de sinalização celular associados à infecção serão examinados.

CUTINA, CERAS E SUBERINA

Todas as partes dos vegetais expostas à atmosfera são cobertas com camadas de material lipídico, o qual reduz a perda de água e auxilia a impedir a entrada de fungos ou bactérias patogênicas. Os principais tipos de revestimento são a cutina, a suberina e as ceras. A cutina é encontrada na maioria das partes aéreas, a suberina está presente nas partes subterrâneas, nos caules lenhosos e nos ferimentos cicatrizados, enquanto as ceras estão associadas à cutina e à suberina.

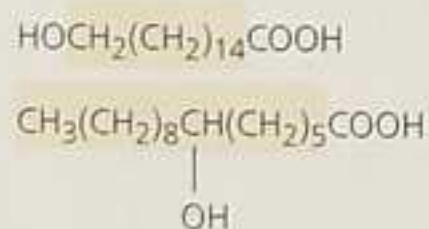
Cutina, ceras e suberina são produzidas a partir de compostos hidrofóbicos

A **cutina** é uma macromolécula, um polímero formado por muitos ácidos graxos de cadeias longas, ligados uns aos outros por ligações ésteres, constituindo uma rede tridimensional rígida. A cutina é formada a partir de ácidos graxos 16:0 e 18:1[1], com grupos hidróxi ou epóxi situados no meio da cadeia ou na extremidade oposta ao ácido carboxílico funcional (Figura 13.1A).

A cutina é o principal constituinte da **cutícula**, uma estrutura secretada, pluriestratificada, que cobre as paredes celulares externas da epiderme das partes aéreas de todas as plantas herbáceas (Figura 13.2). A cutícula é formada por uma cobertura de cera, uma camada intermediária espessa, contendo cutina embebida em cera (a cutícula propriamente dita) e uma camada interna formada de cutina e cera, combinadas com substâncias da parede celular, tais como pectina, celulose e outros carboidratos (a camada cuticular). Estudos recentes sugerem que, além da cutina, a cutícula pode conter um segundo polímero lipídico, formado de hidrocarbonetos de cadeias longas, que tem sido denominado *cutano* (Jeffree, 1996).

(A) Ácidos graxos hidróxi são polimerizados para formar a **cutina**:

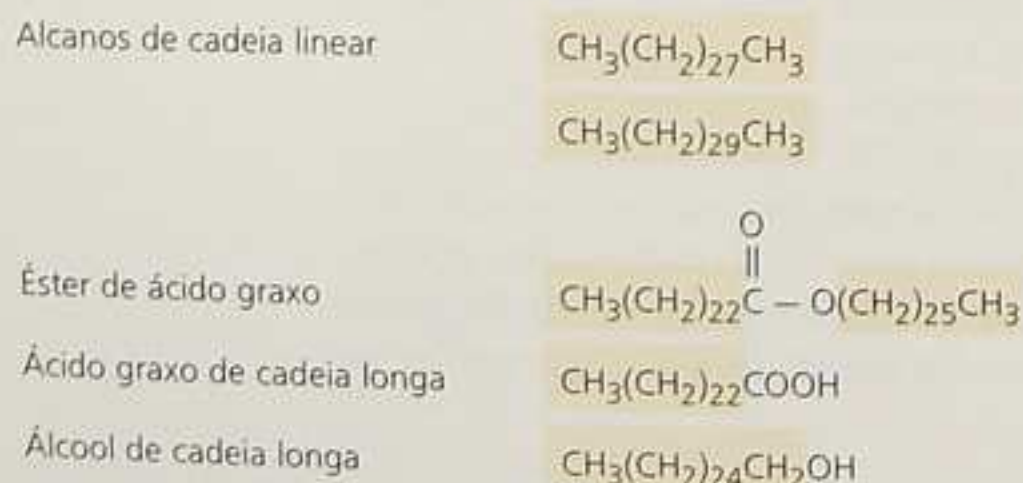
$HOCH_2(CH_2)_{14}COOH$

$CH_3(CH_2)_8CH(OH)(CH_2)_5COOH$

(B) Componentes comuns das **ceras**:

Alcanos de cadeia linear: $CH_3(CH_2)_{27}CH_3$; $CH_3(CH_2)_{29}CH_3$

Éster de ácido graxo: $CH_3(CH_2)_{22}C(=O)-O(CH_2)_{25}CH_3$

Ácido graxo de cadeia longa: $CH_3(CH_2)_{22}COOH$

Álcool de cadeia longa: $CH_3(CH_2)_{24}CH_2OH$

(C) Os ácidos graxos hidróxi que polimerizam juntamente com outros constituintes para formar a **suberina**:

$HOCH_2(CH_2)_{14}COOH$

$HOOC(CH_2)_{14}COOH$ (ácido dicarboxílico)

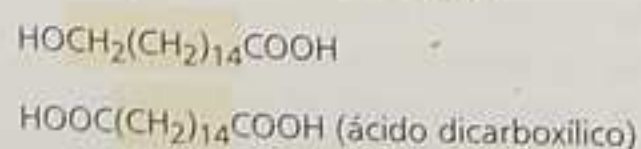



FIGURA 13.1 Constituintes de (A) cutina, (B) ceras e (C) suberina.

FIGURA 13.2 (A) Esquema da estrutura da cutícula, a cobertura protetora da epiderme das folhas e de caules jovens no estádio de folhas completamente expandidas. (B) Electromicrografia de uma célula glandular da cutícula de uma folha jovem (*Laminum* sp.), mostrando a presença de camadas cuticulares indicadas em A, com exceção das ceras epicuticulares, as quais não são visualizadas. (51.000x) (A, segundo Jeffree 1996; B, de Gunning e Steer 1996).

As **ceras** não são macromoléculas, mas uma complexa mistura de acil lipídeos de cadeia longa, os quais são extremamente hidrofóbicos. Os componentes mais comuns das ceras são os alcanos de cadeia linear e os álcoois de 25 a 35 átomos de carbono (ver Figura 13.1B). Nas ceras são também encontrados aldeídos de cadeia longa, cetonas, ésteres e ácidos graxos livres. As ceras da cutícula são sintetizadas pelas células epidérmicas e daí liberadas em gotas, que passam através dos poros da parede celular por um mecanismo ainda desconhecido. Freqüentemente, a cobertura superior da cera cuticular cristaliza em um complexo-padrão de hastes, tubos ou lâminas (Figura 13.3).

A **suberina** é um polímero cuja estrutura é pouco compreendida. Assim tal como a cutina, a suberina é formada por ácidos graxos hidróxi ou epóxi unidos por ligações ésteres. Entretanto, a

[1]Rever Capítulo 11: A nomenclatura dos ácidos graxos é padronizada por X:Y, onde X é o número de átomos de carbono e Y é o número de ligações duplas *cis*.

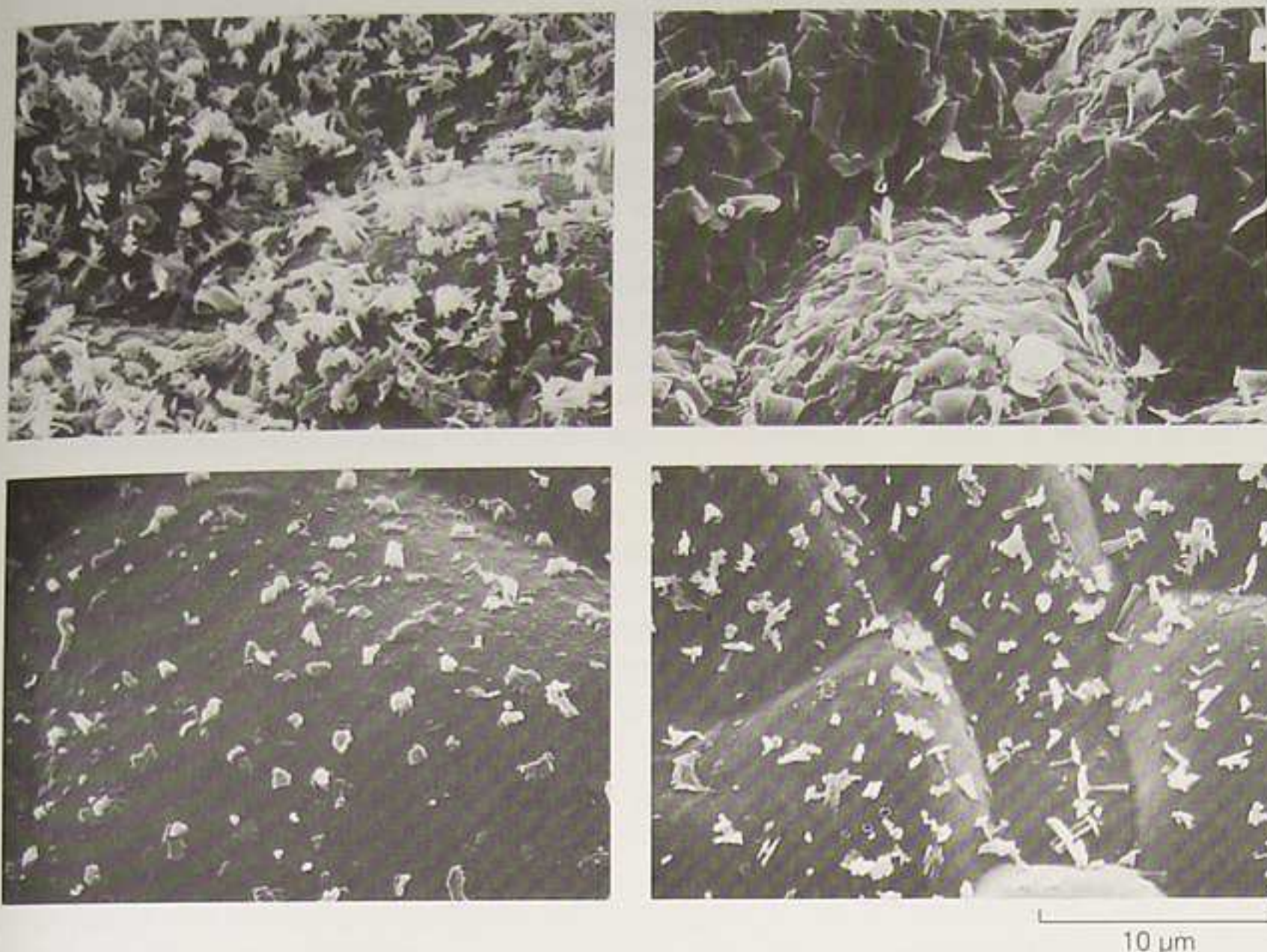



FIGURA 13.3 Diferentes formas de depósitos de ceras epicuticulares, as quais formam a camada superior da cutícula. Estas electromicrografias de varredura mostram a superfície foliar de duas diferentes variedades de *Brassica oleracea*, as quais diferem na estrutura cristalina da cera (de Eigenbrode e cols., 1991, cortesia de S. D. Eigenbrode, com permissão da Entomological Society of America).

suberina difere da cutina por apresentar, na sua estrutura, ácidos dicarboxílicos (ver Figura 13.1C), além de componentes de cadeias longas e de uma significativa proporção de compostos fenólicos.

A suberina é um constituinte da parede celular encontrada em muitas partes do vegetal. Sua presença foi observada nas estrias de Caspary na endoderme de raízes, a qual forma uma barreira entre o apoplasto do córtex e o estelo (ver Capítulo 4). A suberina é o principal componente das paredes celulares externas de todos os órgãos subterrâneos e está associada às células suberizadas da **periderme**, tecido que constitui a casca externa dos caules e raízes durante o crescimento secundário das plantas lenhosas. A suberina também se forma nos locais de abscisão foliar e nas áreas danificadas por doenças ou ferimentos.

Cutina, ceras e suberina auxiliam na redução da transpiração e da invasão de patógenos

A cutina, a suberina e as ceras associadas formam barreiras entre as plantas e seus ambientes e agem evitando a dessecação e a entrada de patógenos. A cutícula é bastante efetiva em evitar a perda de água nas partes aéreas da planta, mas não bloqueia a transpiração completamente, uma vez que, mesmo com os estômatos fechados, há perda de água. A espessura da cutícula varia de acordo com as condições ambientais. As espécies vegetais nativas de ambientes áridos apresentam cutículas mais espessas do que espécies de ambientes úmidos. Porém, plantas de ambientes úmidos freqüentemente desenvolvem cutículas espessas quando cultivadas em condições de seca.

A cutícula e o tecido suberizado são agentes importantes na exclusão de fungos e bactérias, embora não sejam essenciais na resistência a patógenos da mesma forma que algumas das outras defesas que serão discutidas neste capítulo. Muitos fungos penetram diretamente através da superfície da planta por meios mecânicos. Outros produzem cutinase, uma enzima que hidrolisa a cutina, facilitando, assim, a invasão da planta.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que parecem não ter função direta no seu crescimento e desenvolvimento. Tais substâncias são conhecidas como **metabólitos secundários**, *produtos secundários* ou *produtos naturais*. Os metabólitos secundários em geral não apresentam ação direta conhecida nos processos discutidos neste livro, como na fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos.

Os metabólitos secundários também diferem dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e acil lipídeos) por apresentarem distribuição restrita no reino vegetal, ou seja, metabólitos secundários específicos são restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas, enquanto que metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal.

Os metabólitos secundários defendem os vegetais contra herbívoros e patógenos

Durante muitos anos, a importância adaptativa da maioria dos metabólitos secundários vegetais era desconhecida. Consideravam-se tais compostos como produtos finais do metabolismo sem função aparente ou mesmo resíduos. Os estudos dessas substânci-

as foram iniciados pelos químicos orgânicos do século XIX e início do século XX, interessados nessas substâncias, pela sua importância como drogas medicinais, venenos, aromatizantes e materiais industriais.

Mais recentemente, foi sugerido que muitos produtos do metabolismo secundário têm funções ecológicas importantes nos vegetais:

- Eles protegem as plantas contra os herbívoros (herbivoria) e contra a infecção por microrganismos patogênicos.
- Eles agem como atrativos para animais polinizadores e dispersores de sementes, bem como agentes na competição planta-planta.

Nas próximas seções deste capítulo serão discutidos os principais tipos de metabólitos secundários vegetais, sua biossíntese, assim como as descobertas sobre suas funções na planta, particularmente sua ação na defesa dos vegetais.

As defesas vegetais são um produto da evolução

Pode-se iniciar perguntando como os vegetais evoluíram para adquirir suas defesas. Segundo os evolucionistas, as defesas vegetais devem ter surgido através de mutações herdadas, seleção natural e mudanças evolutivas. As mutações aleatórias nas rotas do metabolismo primário levaram ao surgimento de novos compostos tóxicos ou deterrentes para herbívoros ou microrganismos patogênicos.

Como esses compostos não eram tóxicos aos seus produtores e o custo metabólico de sua produção não era excessivo, as plantas que os produziam apresentaram maior adaptação reprodutiva, deixando maior número de descendentes e transferindo, assim, suas características de defesa para a geração seguinte.

Curiosamente, os mesmos compostos que aumentam a adaptação reprodutiva das plantas por agirem na defesa contra fungos, bactérias e herbívoros podem também torná-los indesejáveis como alimento para humanos. Muitas plantas cultivadas têm sido artifi-

CO_2
Fotossíntese
METABOLISMO PRIMÁRIO DO CARBONO
Eritrose-4-fosfato
Fosfoenolpiruvato
Piruvato
3-Fosfoglicerato (3-PGA)
Ciclo do ácido tricarboxílico
Acetil CoA
Aminoácidos alifáticos
Rota do ácido chiquímico
Rota do ácido malônico
Rota do ácido mevalônico
Rota MEP
Aminoácidos aromáticos
Produtos secundários nitrogenados
Compostos fenólicos
Terpenos
METABOLISMO SECUNDÁRIO DO CARBONO

FIGURA 13.4 Uma visão simplificada das principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.

cialmente selecionadas para produzir níveis relativamente baixos desses compostos, o que, por conseqüência, pode torná-las mais suscetíveis a insetos e a doenças.

Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais

Os metabólitos secundários vegetais podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados. A Figura 13.4 mostra, de forma simplificada, as rotas envolvidas na biossíntese dos metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.

TERPENOS

Os **terpenos**, ou *terpenóides*, constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral, insolúveis em água e sintetizados a partir da acetil CoA ou de intermediários glicolíticos. Após discutir-se a biossíntese dos terpenos, será examinada a forma como eles agem para repelir herbívoros e como estes evitam os efeitos tóxicos de tais compostos.

Os terpenos são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos

Todos os terpenos derivam-se da união de unidades pentacarbonadas que apresentam um esqueleto ramificado de isopentano:

$$(H_3C)_2CH-CH_2-CH_3$$

Os elementos estruturais básicos dos terpenos são algumas vezes chamados de **unidades isoprênicas**, pois os terpenos, quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos:

$$H_2C{=}C(CH_3)-CH{=}CH_2$$

Assim, todos os terpenos são, ocasionalmente, referidos como *isoprenóides*.

Os terpenos são classificados pelo número de unidades pentacarbonadas que possuem, embora, algumas vezes, extensas modificações metabólicas possam dificultar a identificação dos resíduos originais de cinco carbonos. Os terpenos de 10 carbonos, que têm duas unidades C_5, são chamados de *monoterpenos*; os de 15 carbonos (três unidades C_5) são os *sesquiterpenos* e os terpenos de 20 carbonos (quatro unidades C_5), os *diterpenos*. Os maiores terpenos incluem *triterpenos* (30 carbonos), *tetraterpenos* (40 carbonos) e *politerpenóides* ($[C_5]_n$ carbonos, onde $n>8$).

Existem duas rotas de biossíntese de terpenos

Os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes, no mínimo. Na **rota do ácido mevalônico**, três moléculas de acetil CoA são ligadas, a partir de uma série etapas da rota, para formar o ácido mevalônico (Figura 13.5). Esse importante intermediário de seis carbonos é então pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir **isopentenil difosfato** (IPP[2]).

O IPP é a unidade ativa básica na formação dos terpenos. Recentemente, foi descoberto que o IPP também pode ser formado a partir de intermediários da glicólise ou do ciclo de redução fotossintética do carbono, através de um conjunto de reações denominado **rota do metileritritol fosfato (MEP)**, que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos (Lichtenthaler, 1999). Embora nem todos os detalhes tenham sido esclarecidos, o *gliceraldeído-3-fosfato* e dois átomos de carbono derivados do *piruvato* parecem se combinar para formar um intermediário que, eventualmente, é convertido em IPP.

O isopentenil difosfato e seu isômero se combinam para formar terpenos maiores

O isopentenil difosfato e seu isômero, dimetilalil difosfato (DMAPP) são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente, IPP e DMAPP reagem e formam o geranil difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos (ver Figura 13.5). O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranilgeranil difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}), respectivamente.

Alguns terpenos têm ação no crescimento e no desenvolvimento dos vegetais

Certos terpenos têm função bem caracterizada no crescimento e no desenvolvimento vegetal, podendo ser considerados como metabólitos primários em vez de secundários. Por exemplo, as giberelinas, um importante grupo de hormônios vegetais, são diterpenos. Os esteróis são derivados de tripterpenos, componentes essenciais das membranas celulares, as quais são estabilizadas pela interação desses compostos com os fosfolipídeos (ver Capítulo 11). Os carotenóides de cores vermelha, amarela e laranja são tetraterpenos que agem como pigmentos acessórios na fotossíntese e protegem os tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (ver Capítulo 7). O hormônio ácido abscísico (ver Capítulo 23) é um terpeno C_{15}, produzido pela degradação de um precursor de carotenóide.

Álcoois politerpênicos de cadeias longas, conhecidos como *dolicols*, agem como transportadores de açúcares na parede celular e na síntese de glicoproteínas (ver Capítulo 15). As cadeias laterais derivadas de terpenos, tais como a cadeia lateral de fitol da clorofila (ver Capítulo 7), auxiliam na ancoragem de certas moléculas nas membranas. Assim, vários terpenos desempenham papel primário importante nos vegetais. Entretanto, a grande maioria das diferentes estruturas terpênicas produzidas pelos vegetais é produto do metabolismo secundário, provavelmente relacionada com a defesa vegetal.

[2]IPP é abreviatura de isopentenil *piro*fosfato, uma denominação antiga para este composto. Os outros intermediários pirofosforilados da rota metabólica são também agora referidos como *di*fosfatos.

3× Acetil CoA (C_2)

Gliceraldeído-3-fosfato (C_3)

Piruvato (C_3)

Rota do mevalonato

Ácido mevalônico

Metileritritol fosfato (MEP)

Rota do metileritritol fosfato

Isopentenil difosfato (IPP, C_5)

Dimetialil difosfato (DMAPP, C_5)

Isoprene (C_5)

Geranil difosfato (GPP, C_{10})

Monoterpenos (C_{10})

Farnesil difosfato (FPP, C_{15})

Sesquiterpenos (C_{15})

2×

Tripterpenos (C_{30})

Geranilgeranil difosfato (GGPP, C_{20})

Diterpenos (C_{20})

2×

Tetraterpenos (C_{40})

Politerpenóides

FIGURA 13.5 Esquema da biossíntese de terpenos. As unidades pentacarbonadas básicas dos terpenos são sintetizadas por duas vias diferentes. Os intermediários fosforilados, IPP e DMAPP, combinam-se para formar terpenos de 10 e 15 carbonos ou maiores.

Os terpenos agem na defesa de muitos vegetais contra os herbívoros

Os terpenos são tóxicos e deterrentes para muitos insetos e mamíferos herbívoros; assim, eles parecem exercer importantes funções de defesa no reino vegetal (Gershenzon e Croteau, 1992). Por exemplo, os ésteres de monoterpeno, denominados **piretróides**, encontrados em folhas e flores de espécies de *Chrysanthemum*, apresentam grande atividade como inseticida. Os piretróides naturais e sintéticos são ingredientes populares nos inseticidas comerciais, devido à sua baixa persistência no ambiente e à sua pequena toxicidade para mamíferos.

Em coníferas, como pinheiro e abeto, os monoterpenos são acumulados nos ductos resiníferos, encontrados nas acículas, nos

ramos e nos troncos. Esses compostos são tóxicos para um grande número de insetos, incluindo as espécies do gênero *Ips*, os quais são insetos-praga de espécies de coníferas em todo o mundo. Várias coníferas respondem à infestação de tais insetos produzindo quantidades adicionais de monoterpenos (Trapp e Croteau, 2001).

Muitos vegetais possuem misturas de monoterpenos e sesquiterpenos voláteis, chamados de **óleos essenciais**, os quais conferem aroma característico às suas folhas. Hortelã-pimenta, limão, manjericão e sálvia são exemplos de plantas que possuem óleos essenciais. O principal monoterpeno constituinte do óleo da hortelã-pimenta é o mentol, e do óleo do limão, o limoneno (Figura 13.6).

Os óleos essenciais apresentam reconhecidas propriedades como repelentes de insetos, sendo freqüentemente encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme e agem como advertência sobre a toxicidade do vegetal, repelindo potenciais herbívoros mesmo antes que ataquem. Nos tricomas glandulares, os terpenos são armazenados em um espaço extracelular modificado na parede celular (Figura 13.7). Os óleos essenciais podem ser extraídos dos vegetais por meio de destilação por arraste a vapor, sendo importantes comercialmente como aromatizantes de alimentos e na indústria de perfumes.

Pesquisas recentes revelaram um aspecto interessante na função protetora dos terpenos voláteis. Em milho, algodão, tabaco selvagem e outras espécies, certos monoterpenos e sesquiterpenos são produzidos e liberados somente após o inseto ter iniciado a ingestão da planta. Tais substâncias repelem herbívoros ovipositores e atraem inimigos naturais, incluindo insetos predadores e parasitas, que matam os insetos herbívoros e, assim, minimizam danos adicionais (Turlings e cols., 1995; Kessler e Baldwin, 2001). Assim, os terpenos voláteis não só agem diretamente na proteção, como também propiciam que os vegetais que os produzem obtenham auxílio de outros organismos para sua defesa. A capacidade das plantas em atrair inimigos naturais de insetos herbívoros surge como uma nova alternativa ecológica para controle de pragas (ver **Ensaio 13.1 na Internet**).

Entre os compostos terpênicos não-voláteis e repelentes de herbívoros estão os **limonóides**, um grupo de triterpenos (C_{30}) reconhecido por seu sabor amargo nas frutas cítricas. Talvez o metabólito deterrente para insetos herbívoros mais conhecido e eficaz seja a *azadiractina* (Figura 13.8A), um limonóide complexo obtido de *Azadirachta indica*, da Ásia e África, conhecida como *neem**. A azadiractina age como deterrente para alguns insetos em doses baixas como 50 ppb e exerce uma variedade de efeitos tóxicos (Aerts e Mordue, 1997). Essa substância tem sido considerada como um potencial inseticida comercial, por sua baixa toxicidade para mamíferos, sendo que várias preparações contendo azadiractina estão sendo comercializadas na América do Norte e na Índia.

As **fitoecdisonas**, primeiramente isoladas da pteridófita *Polypodium vulgare*, constituem um grupo de esteróides vegetais que apresentam a mesma estrutura básica dos hormônios de muda de insetos (Figura 13.8B). A ingestão de fitoecdisonas pelos insetos interrompe este e outros processos de desenvolvimento, muitas vezes com conseqüências letais.

FIGURA 13.7 Monoterpenos e sesquiterpenos são normalmente encontrados em tricomas glandulares na superfície da planta. Esta electromicrografia de varredura mostra um tricoma glandular em uma folha jovem de *Balsamorhiza sagittata*. Acredita-se que os terpenos sejam sintetizados nas células do tricoma e armazenados em uma cabeça esférica no topo. A "cabeça" é um espaço extracelular que se forma quando a cutícula e uma parte da parede celular separam-se do restante da célula. (1105×) (© J.N.A. Lott/ Biological Photo Service)

(A)

CH_3, H_3C, CH_2

Limoneno

(B)

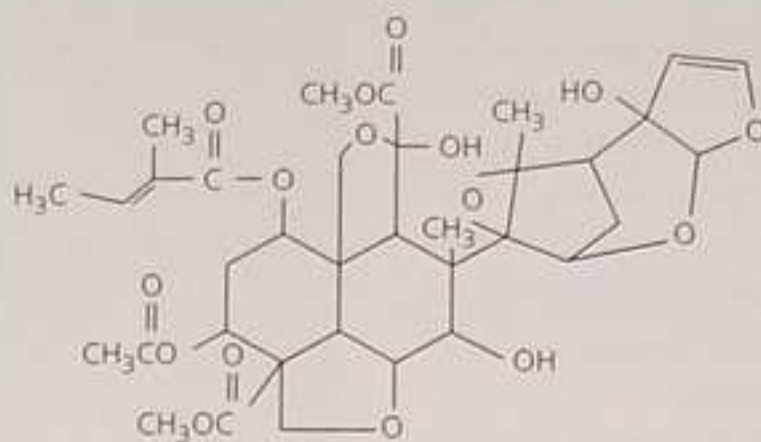
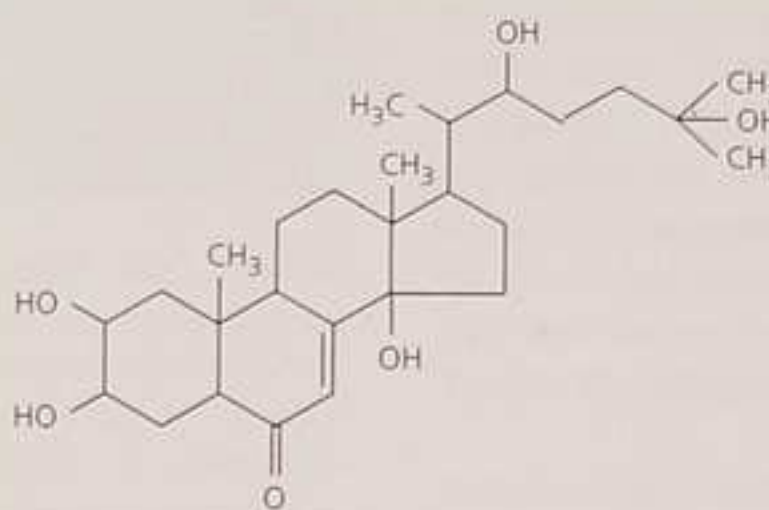
CH_3, OH, H_3C, CH_3

Mentol

FIGURA 13.6 Estruturas químicas do limoneno (A) e do mentol (B). Estes dois monoterpenos agem como defesas contra insetos e outros organismos que se alimentam dessas plantas. (A, fotografia © Calvin Larsen/Photo Researches, Inc.; B, fotografia © David Sieren/Visuals Unlimited)

*N. de T. No Brasil, a azadiractina é obtida a partir de *Melia azedarach* L., conhecida como cinamomo ou Santa-Bárbara.

FIGURA 13.8 Estrutura de dois triterpenos, azadiractina (A) e α-ecdisona (B), os quais agem como potentes deterrentes a insetos (A, fotografia © Inga Spence/Visuals Unlimited; B, fotografia © Wally Eberhart/Visuals Unlimited).

(A) Azadiractina, um limonóide

(B) α-Ecdisona, um hormônio de muda de insetos

Os tripterpenos ativos contra herbívoros vertebrados incluem os cardenolídeos e as saponinas. Os **cardenolídeos** são glicosídeos (compostos que contêm um ou mais resíduos de açúcar ligados) que apresentam gosto amargo e são extremamente tóxicos para os animais superiores. Em humanos, eles apresentam efeitos drásticos na musculatura cardíaca devido à sua influência nas ATPases ativadas por Na^+/K^+. Em doses cuidadosamente reguladas, eles diminuem e fortalecem os batimentos cardíacos. Os cardenolídeos extraídos de espécies como dedaleira ou digital (*Digitalis*) são prescritos a milhões de pacientes para o tratamento de doenças cardíacas (ver **Tópico 13.1 na Internet**).

As **saponinas** são esteróides e os triterpenos glicosídeos, assim chamadas em decorrência de sua ação detergente e emulsificante. A presença de elementos lipofílicos (esteróides ou triterpenos) e hidrofílicos (açúcares) na mesma molécula confere à saponina propriedades detergentes, formando espuma quando misturada à água. Acredita-se que a toxicidade da saponina deve-se à sua capacidade de formar complexos com os esteróides, podendo interferir na absorção de tais compostos pelo sistema digestivo ou desorganizar membranas celulares após entrar na corrente sangüínea.

COMPOSTOS FENÓLICOS

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol — um grupo hidroxila funcional em um anel aromático:

Tais substâncias são classificadas como compostos fenólicos. Os **fenóis** vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos: alguns são solúveis apenas em solventes orgânicos, outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água e há, ainda, aqueles que são grandes polímeros insolúveis.

Devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam uma variedade de funções nos vegetais. Após um breve relato sobre a biossíntese dos fenóis, serão discutidos os principais grupos de compostos fenólicos e suas funções nas plantas. Muitos agem como compostos de defesa contra herbívoros e patógenos. Outros têm função no suporte mecânico, como atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos, na proteção contra a radiação ultravioleta ou reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes.

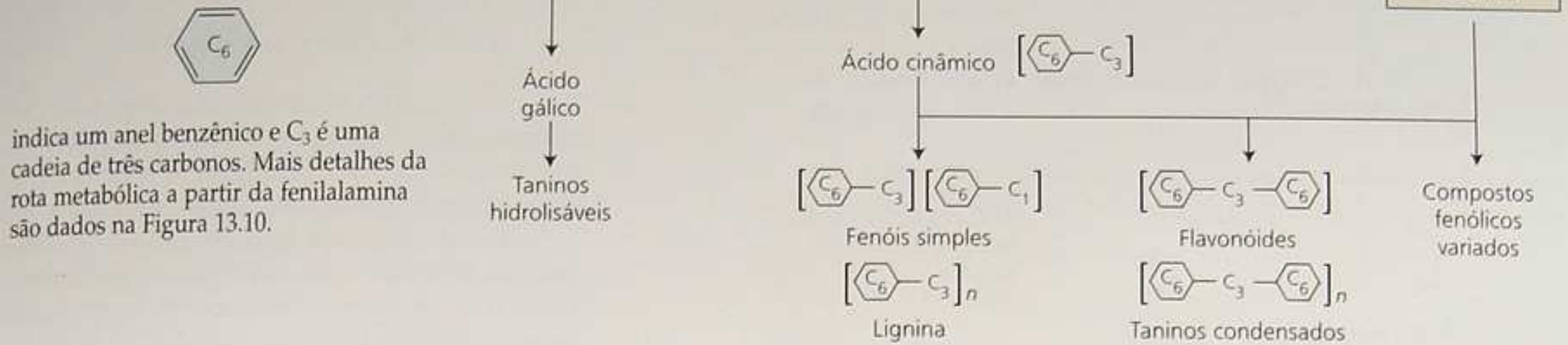
A fenilalanina é um intermediário na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são biossintetizados por meio de diferentes rotas, razão pela qual constituem um grupo bastante heterogêneo do ponto de vista metabólico. Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na síntese dos compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 13.9). A rota do ácido chiquímico participa na biossíntese da maioria dos fenóis vegetais. A rota do ácido malônico, embora seja uma fonte importante de produtos secundários fenólicos em fungos e bactérias, é menos significativa nas plantas superiores.

A **rota do ácido chiquímico** converte precursores de carboidratos derivados da glicólise e da rota da pentose fosfato em aminoácidos aromáticos (ver **Tópico 13.2 na Internet**) (Herrman e Weaver, 1999). Um dos intermediários dessa rota é o ácido chiquímico, que dá o nome a essa seqüência de reações. O conhecido herbicida de amplo espectro, glifosato (disponível comercialmente como Roundup) mata os vegetais por bloquear uma etapa desta

FIGURA 13.9 Compostos fenólicos de vegetais são biossintetizados de várias maneiras. Nas plantas superiores, a maioria dos fenóis é derivada, pelo menos em parte, da fenilalanina, um produto da rota do ácido chiquímico. As fórmulas entre parênteses indicam o arranjo básico dos esqueletos de carbono:

C_6

indica um anel benzênico e C_3 é uma cadeia de três carbonos. Mais detalhes da rota metabólica a partir da fenilalamina são dados na Figura 13.10.

rota metabólica (ver **Capítulo 2 na Internet**). A rota do ácido chiquímico está presente em plantas, fungos e bactérias, mas não é encontrada em animais, os quais não podem sintetizar três aminoácidos aromáticos — fenilalanina, tirosina e triptofano — que são, portanto, nutrientes essenciais na sua dieta.

A classe mais abundante de compostos fenólicos secundários em plantas é derivada da fenilalanina, por meio da eliminação de uma molécula de amônia para formar o ácido cinâmico (Figura 13.10). Essa reação é catalisada pela **fenilalanina amonialiase (PAL)**, talvez a enzima mais estudada no metabolismo secundário vegetal. A PAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, de forma que a reação que ela catalisa é uma etapa reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos.

A atividade da PAL é aumentada por fatores ambientais, tais como baixos níveis de nutrientes, luz (pelo seu efeito no fitocromo) e infecção por fungos. O ponto de controle parece estar no início da transcrição. A invasão de fungos, por exemplo, desencadeia a transcrição do RNA mensageiro que codifica a PAL, aumentando a quantidade de PAL na planta, o que, então, estimula a síntese de compostos fenólicos.

Em muitas espécies vegetais, a regulação da atividade da PAL torna-se mais complexa pela existência de múltiplos genes que codificam essa enzima, alguns dos quais são expressos somente em tecidos específicos ou sob certas condições ambientais (Logemann e cols., 1995).

As reações subseqüentes àquelas catalisadas pela PAL levam à adição de mais grupos hidroxila e outros substituintes. Os ácidos *trans*cinâmico e *p*-cumárico e seus derivados são compostos fenólicos simples chamados **fenilpropanóides**, por conter um anel benzênico:

C_6

e uma cadeia lateral de três carbonos. Os fenilpropanóides são importantes unidades básicas para a formação de compostos fenólicos mais complexos, que serão discutidos adiante neste capítulo.

Com o conhecimento das rotas biossintéticas que levam à produção dos mais variados compostos fenólicos, os pesquisadores têm voltado sua atenção ao estudo de regulação das rotas metabólicas. Em alguns casos, enzimas específicas, como a PAL, são importantes no controle do fluxo das reações componentes da rota metabólica. Vários fatores de transcrição têm sido apontados como reguladores do metabolismo fenólico, por se ligarem às regiões promotoras de alguns genes biossintéticos, ativando sua transcrição. Alguns desses fatores ativam a transcrição de um grupo maior de genes (Jin e Martin, 1999).

Alguns compostos fenólicos simples são ativados pela luz ultravioleta

Os compostos fenólicos simples são amplamente distribuídos nas plantas vasculares e parecem apresentar diferentes funções. Suas estruturas incluem:

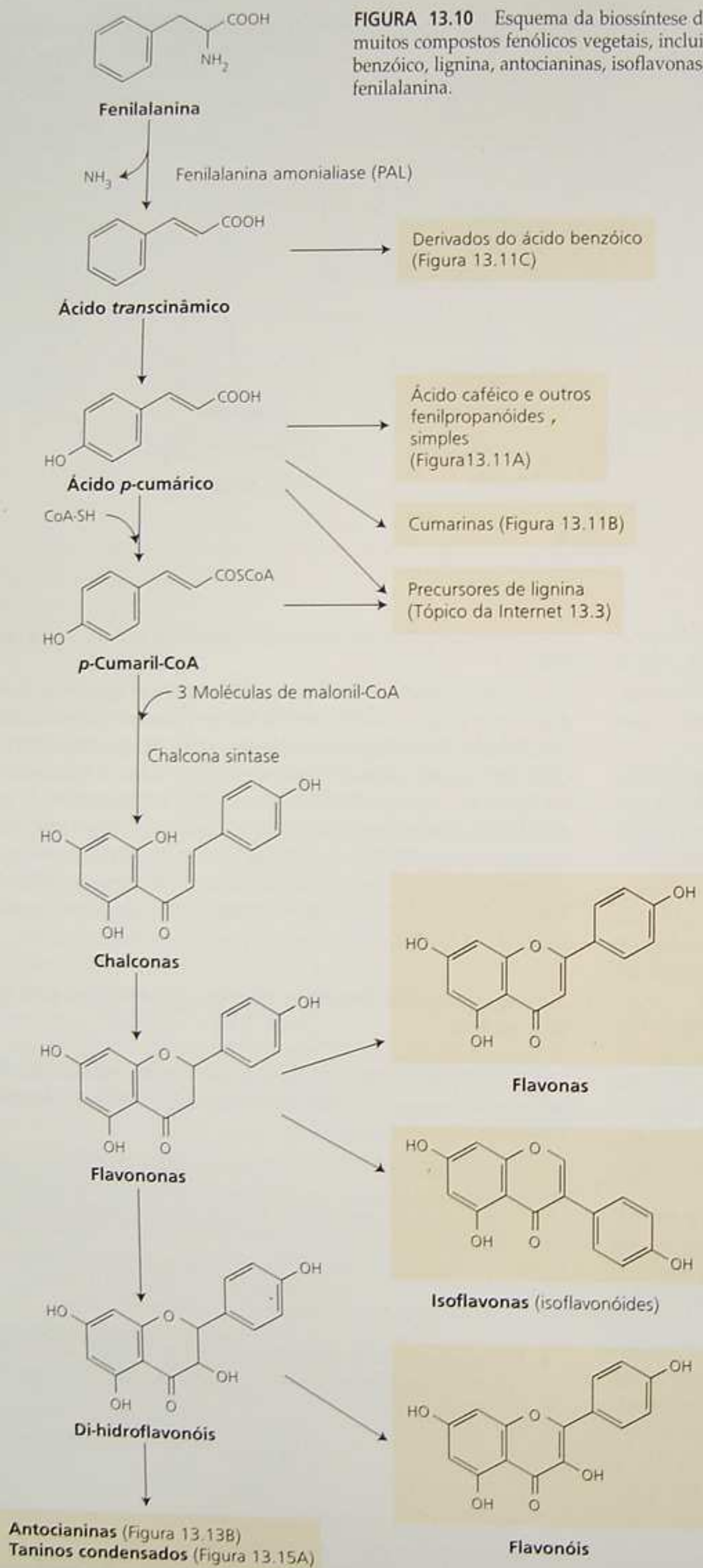
- Fenilpropanóides simples, tais como ácido *trans*cinâmico, ácido *p*-cumárico e seus derivados, como o ácido caféico, os quais apresentam um esqueleto básico de fenilpropanóide (Figura 13.11A)

C_6—C_3

- Lactonas de fenilpropanóides (ésteres cíclicos) chamadas *cumarinas*, também com esqueleto de fenilpropanóide (ver Figura 13.11B)

C_6—C_1

- Derivados do ácido benzóico, os quais apresentam um esqueleto formado a partir de fenilpropanóides pela eliminação de dois carbonos da cadeia lateral (ver Figura 13.11C) (ver também Figura 13.10)

FIGURA 13.10 Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina. A formação de muitos compostos fenólicos vegetais, incluindo fenilpropanóides simples, cumarinas, derivados do ácido benzóico, lignina, antocianinas, isoflavonas, taninos condensados e outros flavonóides inicia com a fenilalanina.

Os vegetais podem modificar os esqueletos carbônicos básicos de compostos fenólicos simples para formar produtos mais complexos da mesma forma como fazem com outros produtos secundários.

Muitos compostos fenólicos simples apresentam funções importantes nos vegetais, agindo como compostos de defesa contra insetos herbívoros e fungos. Atenção especial tem sido dada a fitotoxicidade de certas cumarinas, as **furanocumarinas**, que apresentam um anel furano (ver Figura 13.11B).

Esses compostos são atóxicos até que a luz os ative. A luz solar, na faixa do ultravioleta A (UV-A; 320-400 nm) eleva algumas furanocumarinas a um estado eletrônico de alta energia. As furanocumarinas fotoativadas podem se inserir na dupla hélice do DNA e ligar-se às bases pirimídicas, citosina e timina, bloqueando a transcrição e o reparo do DNA, provocando, ocasionalmente, a morte celular.

As furanocumarinas fototóxicas são especialmente abundantes em membros da família Umbelliferae, incluindo aipo, salsa e *Pastinaca sativum*. No aipo, o nível de tais compostos pode aumentar até 100 vezes em plantas estressadas ou doentes. Pessoas que colhem aipo ou mesmo alguns consumidores podem desenvolver irritações na pele pelo contato com a planta doente ou estressada. Alguns insetos têm se adaptado a sobreviver em plantas com furanocumarinas e outros compostos fototóxicos, por viver em casulos de seda ou em folhas enroladas, que os protegem da ativação desses compostos pela incidência de luz (Sandberg e Berenbaum, 1989).

A liberação dos compostos fenólicos no solo pode limitar o crescimento de outras plantas

Os vegetais liberam no ambiente uma grande variedade de metabólitos primários e secundários a partir de folhas, raízes e serapilheira em decomposição. Os estudos realizados sobre os efeitos desses compostos nas plantas próximas constituem o campo da **alelopatia**. Se uma planta pode reduzir o crescimento das plantas vizinhas pela liberação de compostos químicos no solo, isso pode ter como conseqüência a maior chance de acesso à luz, à água e aos nutrientes e, portanto, propiciar, sua maior adaptação evolutiva. Em geral, o termo alelopatia tem sido aplicado aos efeitos nocivos dos vegetais sobre os espécimes adjacentes, embora a definição precisa também inclua efeitos benéficos.

(A)

Ácido caféico   Ácido ferúlico

Fenilpropanóides simples $[C_6 - C_3]$

(B)

Anel furano

Umbeliferona, uma cumarina simples   Psoraleno, uma furanocumarina

Cumarinas $[C_6 - C_3]$

(C)

Vanilina   Ácido salicílico

Derivados do ácido benzóico $[C_6 - C_1]$

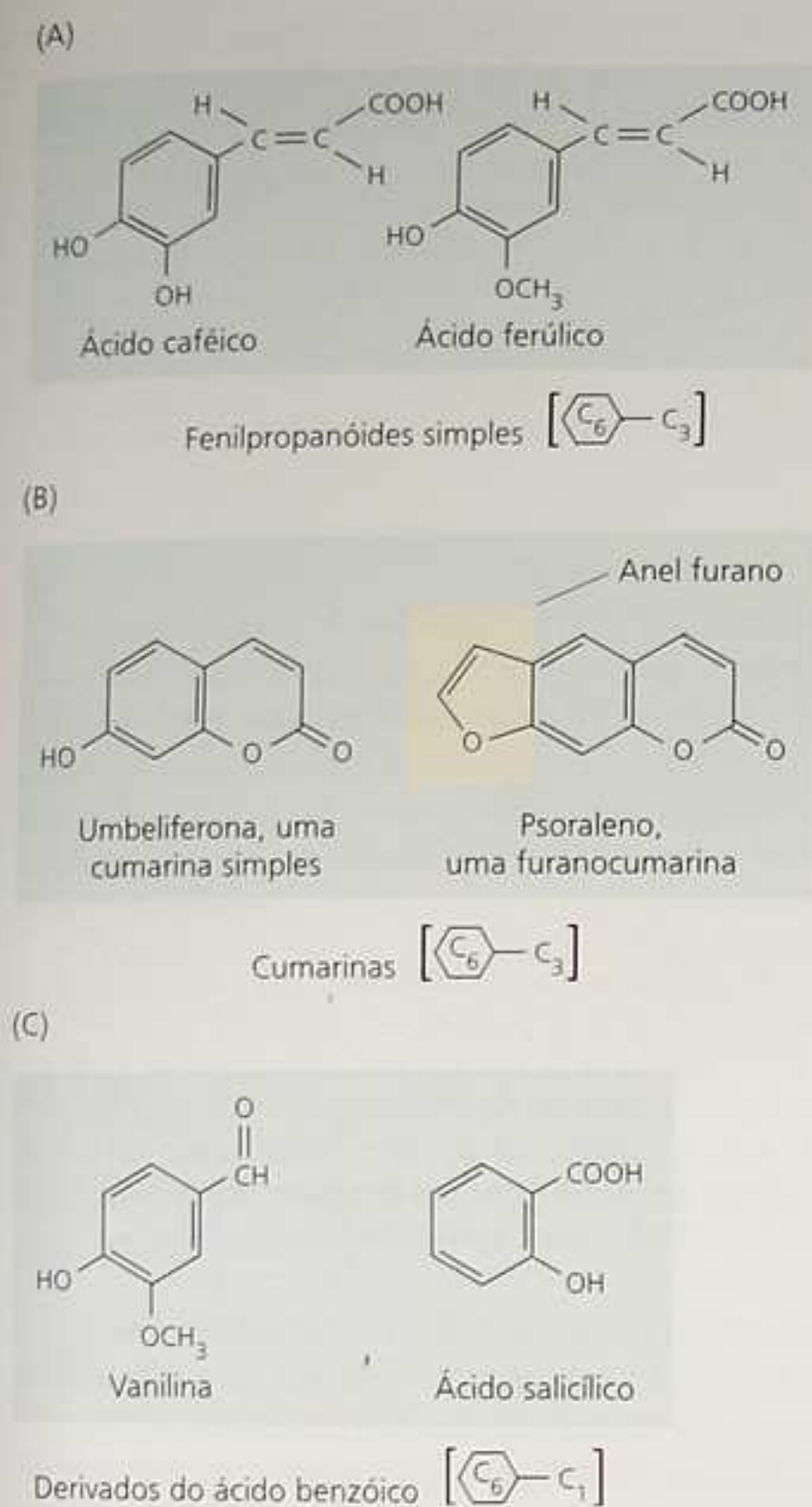



FIGURA 13.11 Os compostos fenólicos simples apresentam uma grande diversidade de funções nos vegetais. (A) O ácido caféico e o ácido ferúlico podem ser liberados no solo e inibir o crescimento das plantas adjacentes. (B) O psoraleno é uma furanocumarina que apresenta efeitos fototóxicos em insetos herbívoros. (C) O ácido salicílico é um regulador de crescimento vegetal que está envolvido na resistência sistêmica a patógenos vegetais.

Os fenilpropanóides simples e derivados do ácido benzóico são freqüentemente citados como alelopáticos. O ácido caféico e o ácido ferúlico (ver Figura 13.11 A) ocorrem no solo em quantidades apreciáveis e foi demonstrado, em laboratório, que eles inibem a germinação e crescimento de muitas plantas (Inderjit e cols., 1995).

Apesar de resultados como esses, a importância da alelopatia em ecossistemas naturais ainda é controversa. Muitos cientistas duvidam de que a alelopatia seja um fator significativo na interação planta-planta, pois as evidências sobre tal fenômeno são de difícil obtenção. É fácil mostrar que os extratos ou os compostos purificados de uma planta possam inibir o crescimento de outra planta em experimentos de laboratório, mas não tem sido muito fácil demonstrar que esses compostos estejam presentes no solo em quantidades suficientes para inibir o crescimento. Além disso, as substâncias orgânicas no solo estão, muitas vezes, ligadas a partículas do solo e podem ser rapidamente degradadas por microrganismos.

Apesar da falta de evidências, a alelopatia tem atraído grande interesse devido às suas aplicações potenciais na agricultura. A diminuição da produtividade causada por plantas invasoras ou por resíduos da cultura anterior pode, em alguns casos, ser resultado da alelopatia. Uma perspectiva interessante é o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas para serem alelopáticas às plantas invasoras.

A lignina é uma macromolécula fenólica altamente complexa

Depois da celulose, a substância orgânica mais abundante nas plantas é a **lignina**, um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificado

$C_6 - C_3$

que apresenta funções primária e secundária. A estrutura precisa da lignina não é conhecida devido à dificuldade de extrair lignina das plantas, pois está covalentemente ligada à celulose e a outros polissacarídeos da parede celular.

A lignina é em geral formada por três diferentes álcoois de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapil, álcoois, que são sintetizados a partir da fenilalanina através de vários derivados do ácido cinâmico. Esses álcoois formam um polímero pela ação de enzimas que geram radicais livres intermediários. As proporções das três unidades monoméricas na lignina variam entre as espécies, os órgãos vegetais e, mesmo, as camadas de uma única parede celular. No polímero, há com freqüência, múltiplas ligações C-C e C-O-C em cada unidade de álcool, resultando em uma estrutura complexa, que se ramifica em três dimensões. Ao contrário de polímeros como o amido, a borracha ou a celulose, as unidades de lignina não parecem estar ligadas de um modo simples e repetido. Entretanto, pesquisas recentes sugerem que uma proteína-guia pode ligar unidades individuais de fenilpropanóide durante a biossíntese de lignina, originando um esqueleto que então dirige a formação de uma unidade maior e repetida (Davin e Lewis, 2000; Hatfield e Vermerris, 2001). (Ver **Tópico 13.3 da Internet**, para a estrutura de uma molécula hipotética de lignina.)

A lignina é encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos de sustentação e vascular, especialmente em traqueídes e elementos de vaso. Ela é depositada sobretudo no espessamento da parede secundária, mas também pode ocorrer na parede primária e na lamela média, em íntimo contato com a celulose e hemicelulose já presentes. A rigidez mecânica da lignina fortalece os caules e o tecido vascular, permitindo o crescimento ascendente e possibilitando que a água e os sais minerais sejam conduzidos através do xilema sob pressão negativa, sem haver o colapso do tecido. Uma vez que a lignina é um componente-chave do tecido de transporte de água, a capacidade de produzir lignina deve ter sido uma das adaptações mais importantes, que permitiu que as plantas colonizassem o ambiente terrestre.

Além de proporcionar suporte mecânico, a lignina desempenha funções protetoras importantes nos vegetais. Sua resistência física coíbe seu consumo pelos herbívoros e sua estabilidade química torna-a relativamente indigerível por esses animais. Por sua capacidade de ligação à celulose e às proteínas, a lignina também

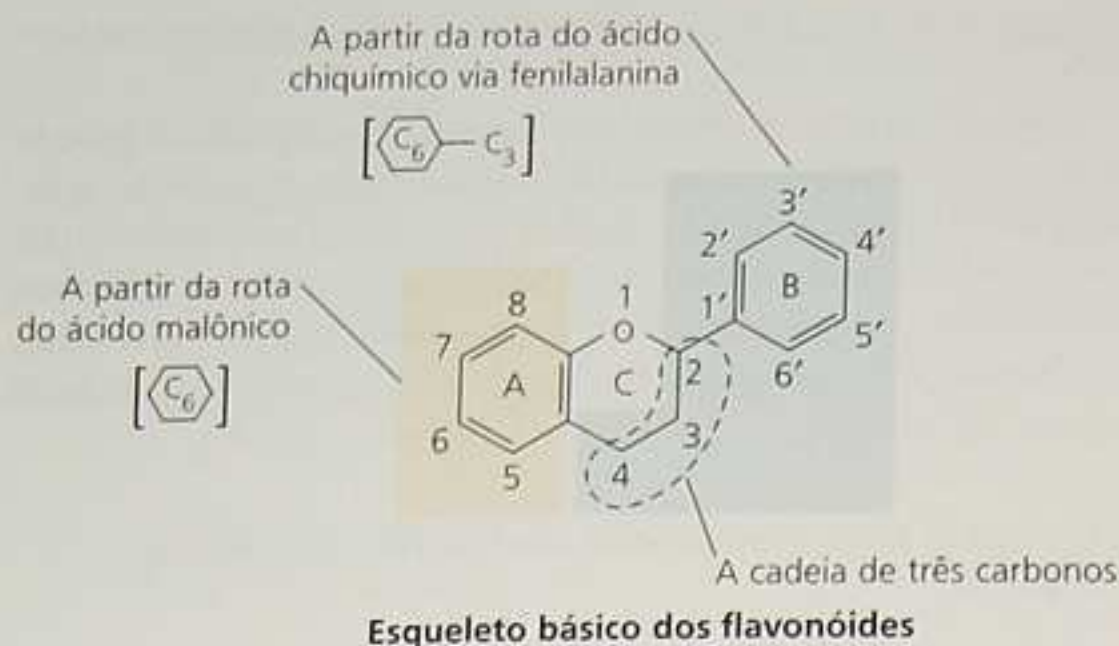



FIGURA 13.12 Estrutura do núcleo fundamental dos flavonóides. Os flavonóides são biossintetizados a partir de produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico. As posições dos átomos de carbono recebem numeração conforme indicado.

FIGURA 13.13 As estruturas das antocianidinas (A) e antocianinas (B). As cores das antocianidinas dependem, em parte, dos substituintes ligados ao anel B (ver Tabela 13.1). Um aumento no número de grupos hidroxila altera a absorção para um comprimento de onda mais longo, resultando na cor azul. A substituição do grupo hidroxila por um grupo metoxila (OCH_3) altera a absorção para um comprimento de onda um pouco mais curto, resultando na cor avermelhada.

reduz a digestibilidade dessas substâncias. A lignificação bloqueia o crescimento de patógenos e é uma resposta freqüente à infecção ou à lesão.

Existem quatro grupos principais de flavonóides

Os flavonóides constituem a maior classe de fenólicos vegetais. O esqueleto de carbono dos flavonóides contém 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos, ligados por uma cadeia de três carbonos:

$$C_6 — C_3 — C_6$$

Esta estrutura é resultante de duas rotas biossintéticas separadas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico (Figura 13.12).

Os flavonóides são classificados em grupos diferentes, primeiramente pelo grau de oxidação da cadeia de três carbonos. Serão discutidos quatro dos grupos mostrados na Figura 13.10: as antocianinas, as flavonas, os flavonóis e as isoflavonas.

O esqueleto de carbono dos flavonóides pode ter vários substituintes. Os grupos hidroxila estão normalmente presentes nas posições 4, 5 e 7, mas também podem ser encontrados em outras posições. Os açúcares são também muito comuns; de fato, a maioria dos flavonóides ocorre naturalmente como glicosídeos.

Enquanto os grupos hidroxila e açúcares aumentam a solubilidade em água dos flavonóides, outros substituintes, tais como éteres metílicos ou unidades isopentil modificadas, tornam os flavonóides lipofílicos (hidrofóbicos). Os tipos diferentes de flavonóides desempenham funções diversas nos vegetais, incluindo pigmentação e defesa.

As antocianinas são flavonóides coloridos que atraem animais

Além das interações presa-predador, há associações mutualísticas entre plantas e animais. Ao mesmo tempo em que retiram néctar ou polpa dos frutos, os animais realizam importantes tarefas para as plantas, atuando como transportadores de pólen e sementes. Os metabólitos secundários estão envolvidos nessas interações planta-animal, atraindo animais para as flores e frutos por produzir sinais visuais e olfativos.

Os pigmentos dos vegetais são de dois tipos principais: os carotenóides e os flavonóides. Os *carotenóides*, conforme foi apresentado, são compostos terpênicos de cores amarela, laranja e vermelha, que também atuam como pigmentos acessórios na fotossíntese (ver Capítulo 7). Os *flavonóides*, por sua vez, são compostos fenólicos que incluem um grande número de substâncias coloridas.

O grupo mais comum dos flavonóides pigmentados consiste das **antocianinas**, as quais são responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul observadas nos vegetais. Por colorir flores e frutos, as antocianinas são de importância vital como atrativo para polinizadores e dispersores de sementes.

As antocianinas são glicosídeos que apresentam açúcares na posição 3 (Figura 13.13B) e, algumas vezes, em outras posições. Sem seus açúcares, as antocianinas são conhecidas como **antocianidinas** (Figura 13.13 A). A cor das antocianinas é influenciada por muitos fatores, incluindo o número de grupos hidroxila e metoxila no anel B da antocianidina (ver Figura 13.13 A), a presença de ácidos aromáticos esterificados ao esqueleto principal e o pH do vacúolo no qual tais compostos estão armazenados. As antocianinas podem também ocorrer em complexos supramoleculares junto a íons metálicos quelados e a co-pigmentos flavonas. Os pigmentos azuis de *Commelina communis* consistem de um grande complexo de seis moléculas de antocianinas, seis flavonas e dois íons magnésio associados (Kondo e cols., 1992). As antocianidinas mais comuns e suas cores estão indicadas na Figura 13.13 e na Tabela 13.1.

TABELA 13.1
Efeito dos substituintes do anel na cor das antocianidinas

Antocianidina	Substituintes	Cor
Pelargonidina	4′—OH	Vermelho alaranjado
Cianidina	3′—OH, 4′—OH	Vermelho violáceo
Delfinidina	3′—OH, 4′—OH, 5′—OH	Azul violáceo
Peonidina	3′—OCH_3, 4′—OH	Vermelho rosado
Petunidina	3′—OCH_3, 4′—OH, 5′—OCH_3	Violeta

Considerando a variedade de fatores que afetam a coloração das antocianinas, bem como a presença dos carotenóides, não é surpreendente que na natureza sejam encontradas tantas tonalidades de cores de flores e frutos. A evolução da cor da flor pode ter sido influenciada por pressões de seleção para diferentes tipos de polinizadores, os quais podem apresentar preferências diversas em relação às cores.

A cor é somente um tipo de sinal utilizado para atrair polinizadores para as flores. Os compostos químicos voláteis, em particular os monoterpenos, muitas vezes funcionam como odores atrativos.

Os flavonóides podem proteger contra os danos causados pela luz ultravioleta

Dois outros grupos de flavonóides encontrados em flores são as **flavonas** e os **flavonóis** (ver Figura 13.10). Via de regra, esses flavonóides absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que as antocianinas, não sendo visíveis ao olho humano. Entretanto, insetos como as abelhas, que enxergam na faixa extrema do ultravioleta, respondem às flavonas e aos flavonóis como sinais atrativos (Figura 13.14). Os flavonóis de uma flor, muitas vezes, formam padrões simétricos de listras, pontos ou círculos concêntricos chamados de *guias de néctario* (Lunau, 1992). Tais padrões podem ser conspícuos a insetos e acredita-se que auxiliam na localização do pólen e do néctar.

As flavonas e os flavonóis não estão restritos às flores; eles também estão presentes nas folhas de todas as plantas verdes. Essas duas classes de flavonóides agem na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B (280-320 nm), pois se acumulam nas camadas epidérmicas das folhas e caules e absorvem intensamente a luz na região do UV-B, enquanto permitem a passagem contínua dos comprimentos de luz visível (fotossinteticamente ativos). Além disso, foi demonstrado que o aumento da exposição de plantas à luz UV-B resulta na maior síntese de flavonas e flavonóis.

Os mutantes de *Arabidopsis thaliana*, que não apresentam a enzima chalcona sintase, não produzem flavonóides. Com a ausência de flavonóides, essas plantas são muito mais sensíveis à radiação UV-B do que os tipos selvagens e crescem pouco sob condições normais. No entanto, quando protegidas da luz UV, essas plantas crescem normalmente (Li e cols., 1993). Um grupo de ésteres de fenilpropanóides simples também apresenta importância na proteção contra luz UV em *Arabidopsis*.

Outras funções dos flavonóides foram recentemente descobertas. Por exemplo, as flavonas e os flavonóis secretados no solo pelas raízes das leguminosas servem de mediadores na interação das plantas com os microrganismos simbiontes fixadores de nitrogênio, um fenômeno descrito no Capítulo 12. Como será discutido no Capítulo 19, estudos recentes sugerem que os flavonóides tam-

(A)

(B)

FIGURA 13.14 A margarida amarela (*Rudbeckia sp*) como vista por humanos (A) e como deve ser vista por abelhas (B). (A) Para humanos, a inflorescência apresenta lígulas amarelas e um disco central marrom. (B) Para abelhas, as extremidades das lígulas aparecem como amarelo-claro, a porção interna das lígulas como amarelo-escuro e o disco central, preto. Os flavonóis que absorvem na região da luz ultravioleta são encontrados nas partes internas das lígulas, mas não nas extremidades. A distribuição dos flavonóis e a sensibilidade dos insetos à parte do espectro UV contribuem para o padrão "olho-de-boi", visto pelas abelhas, o que, possivelmente, as auxilia na localização do pólen e do néctar. Uma iluminação especial foi utilizada para estimular a sensibilidade espectral do sistema visual das abelhas. (Cortesia de Thomas Eisner.)

bém apresentam uma atividade de regulação do desenvolvimento vegetal, como moduladores do transporte polar da auxina.

Os isoflavonóides apresentam atividade antimicrobiana

Os **isoflavonóides** (isoflavonas) constituem um grupo de flavonóides no qual a posição de um anel aromático (anel B) está invertida (ver Figura 13.10). Os isoflavonóides são encontrados principalmente em leguminosas e apresentam várias atividades biológicas. Alguns, como os rotenóides, apresentam potente ação inseticida; outros apresentam atividade antiestrogênica. Por exemplo, ovelhas que se alimentam de trevo, rico em isoflavonóides, freqüentemente, sofrem de infertilidade. O sistema de anéis dos isoflavonóides possui uma estrutura cíclica tridimensional semelhante à estrutura dos esteróides (ver Figura 13.8B), permitindo que tais substâncias liguem-se a receptores de estrogênio. Os isoflavonóides podem, ainda, ser responsáveis pelos efeitos anticancerígenos da alimentação preparada à base de soja.

Nos últimos anos, os isoflavonóides têm se tornado conhecidos pela sua ação como *fitoalexinas*, compostos antimicrobianos sintetizados em resposta à infecção por fungos ou bactérias, que podem limitar a propagação do patógeno invasor. As fitoalexinas serão discutidas em maiores detalhes posteriormente neste capítulo.

Os taninos inibem o ataque de herbívoros

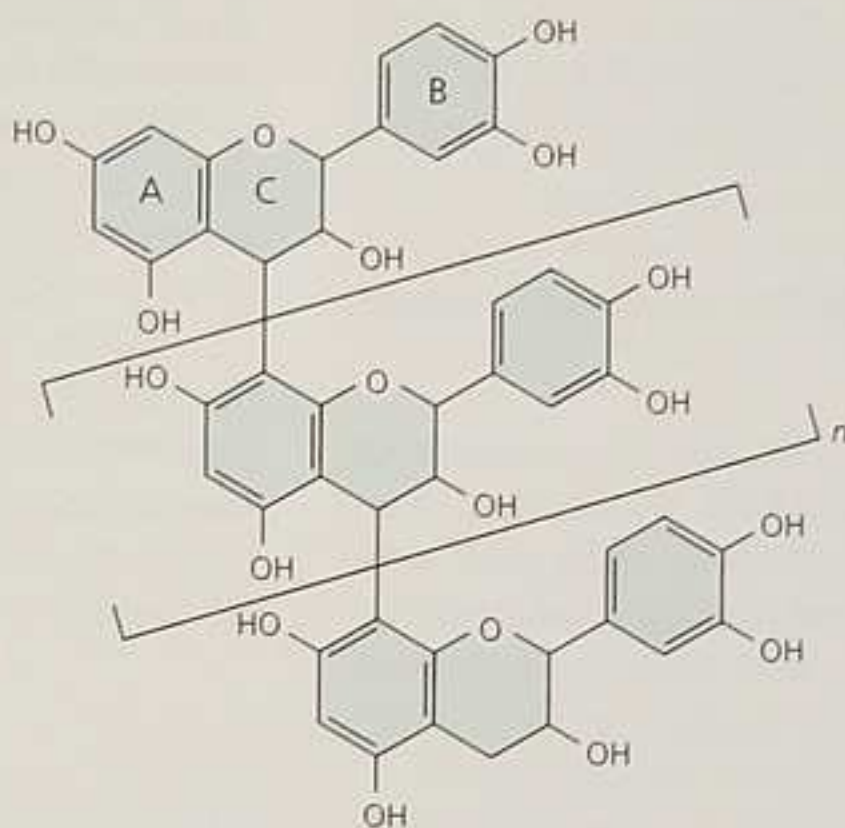
Um segundo grupo de polímeros fenólicos com propriedades de defesa para o vegetal, além das ligninas, são os **taninos**. O termo *tanino* foi primeiramente usado para descrever compostos que poderiam ser utilizados no processamento da pele animal, processo hoje conhecido como curtimento. Os taninos ligam-se às moléculas de colágeno da pele dos animais, aumentando sua resistência ao calor, à água e aos microrganismos.

Há duas categorias de taninos: condensados e hidrolisáveis. Os **taninos condensados** são compostos formados pela polimerização de unidades de flavonóides (Figura 13.15A). Normalmente, são constituintes de plantas lenhosas. Como os taninos condensados podem freqüentemente ser hidrolisados a antocianidinas por tratamento com ácidos fortes, eles muitas vezes são denominados *pro-antocianidinas*.

Os **taninos hidrolisáveis** são polímeros heterogêneos que contêm ácidos fenólicos, em especial ácido gálico e açúcares simples (ver Figura 13.15B). Eles são menores que os taninos condensados e podem ser hidrolisados com mais facilidade, sendo somente necessário ácido diluído. A maioria dos taninos apresenta massa molecular entre 600 e 3.000.

Os taninos são toxinas que reduzem significativamente o crescimento e a sobrevivência de muitos herbívoros, quando adicionados às suas dietas. Da mesma forma, os taninos agem como repelentes alimentares a uma grande variedade de animais. Mamíferos, como bovinos, veados e macacos, evitam plantas, ou partes delas, que apresentem altos níveis de taninos. Frutos imaturos, por exemplo, em geral apresentam altos níveis de taninos, que podem estar concentrados nas camadas celulares mais externas.

Curiosamente, os humanos preferem um certo nível de adstringência nos alimentos que contêm taninos, como maçãs, amoras, chá e vinho tinto. Recentemente, foi demonstrado que os polifenóis (taninos) do vinho tinto impediam a formação de endotelina-1, uma molécula sinalizadora com atividade constritora dos vasos sangüíneos (Corder e cols., 2000). Esse efeito dos taninos pode responder pelos benefícios do vinho para a saúde, principalmente a redução do risco de doenças cardíacas associada ao consumo moderado dessa bebida.

(A) **Tanino condensado**

(B) **Tanino hidrolisável**

Ácido gálico

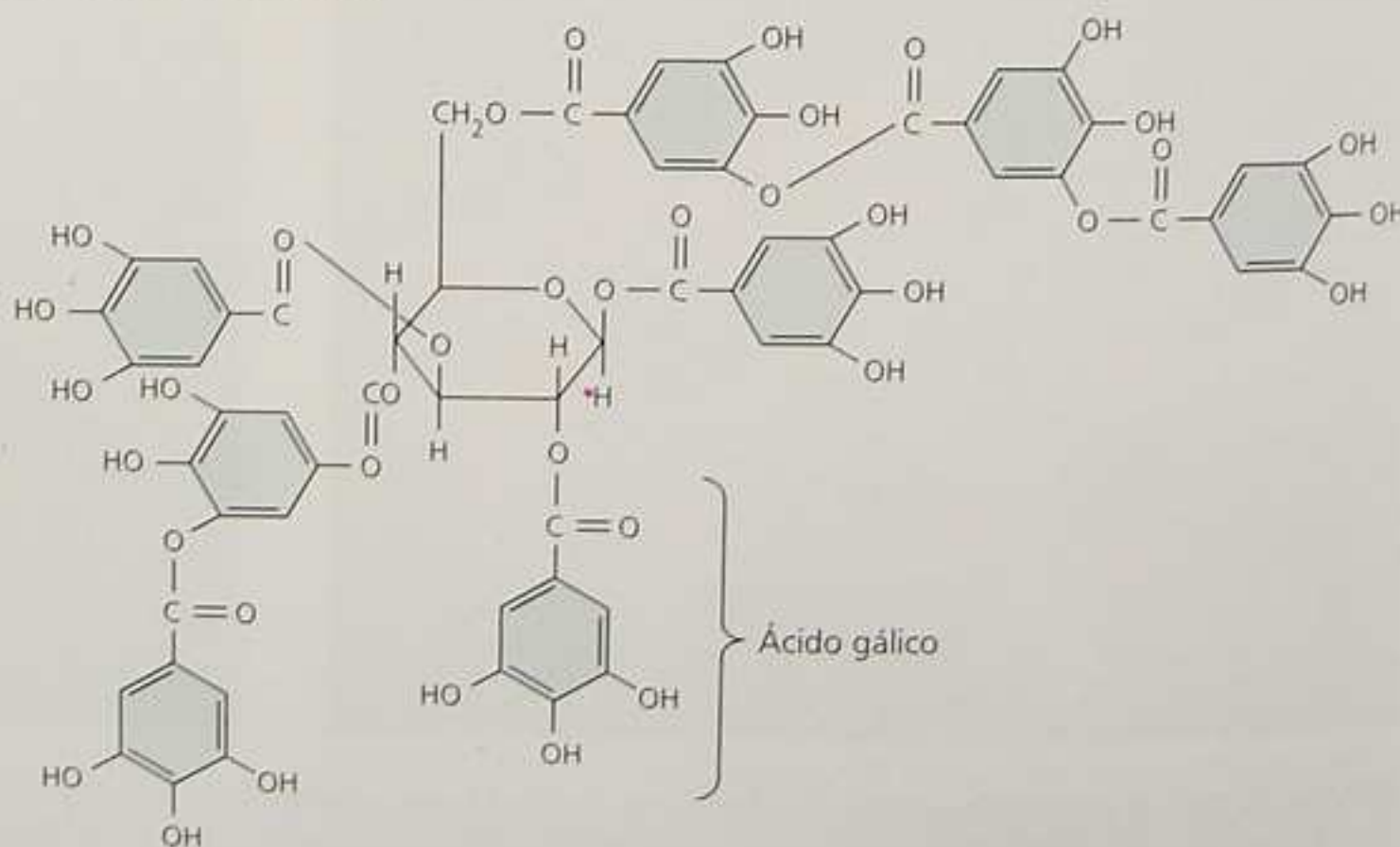
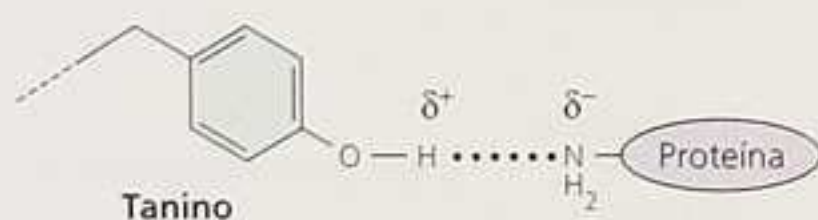



FIGURA 13.15 Estrutura de alguns taninos formados a partir de ácidos fenólicos ou unidades de flavonóides. (A) Estrutura geral de um tanino condensado, onde *n* varia geralmente de 1 a 10. Pode haver um terceiro grupo —OH no anel B. (B) O tanino hidrolisado de *Rhus semialata* consiste de glicose e oito moléculas de ácido gálico.

Embora quantidades moderadas de polifenóis específicos possam trazer benefícios à saúde humana, as propriedades de defesa da maioria dos taninos estão relacionadas à sua toxicidade, a qual é em geral atribuída à capacidade de formar complexos com proteínas de modo não-específico. Acredita-se que os taninos formam complexos com proteínas do trato digestivo dos herbívoros, por formar pontes de hidrogênio entre os seus grupos hidroxila e os sítios eletronegativos na proteína (Figura 13.16 A).

Evidências mais recentes indicam que os taninos e outros compostos fenólicos também podem se ligar de modo covalente a proteínas da dieta (ver Figura 13.16B). A folhagem de muitos vegetais contém enzimas que oxidam os fenóis às suas formas quinônicas correspondentes, no aparelho digestivo dos herbívoros (Felton e cols., 1989). As quinonas são moléculas eletrofílicas, altamente reativas, que rapidamente reagem com os grupos nucleofílicos — NH_2 — e SH das proteínas (ver Figura 13.16B). Independentemente do mecanismo pelo qual ocorra a ligação da proteína com o tanino, esse processo tem um impacto negativo na nutrição dos herbívoros. Os taninos podem inativar enzimas digestivas e criar um complexo de taninos e proteínas vegetais difíceis de digerir.

(A) Pontes de hidrogênio entre taninos e proteína

(B) Ligação covalente à proteína após oxidação

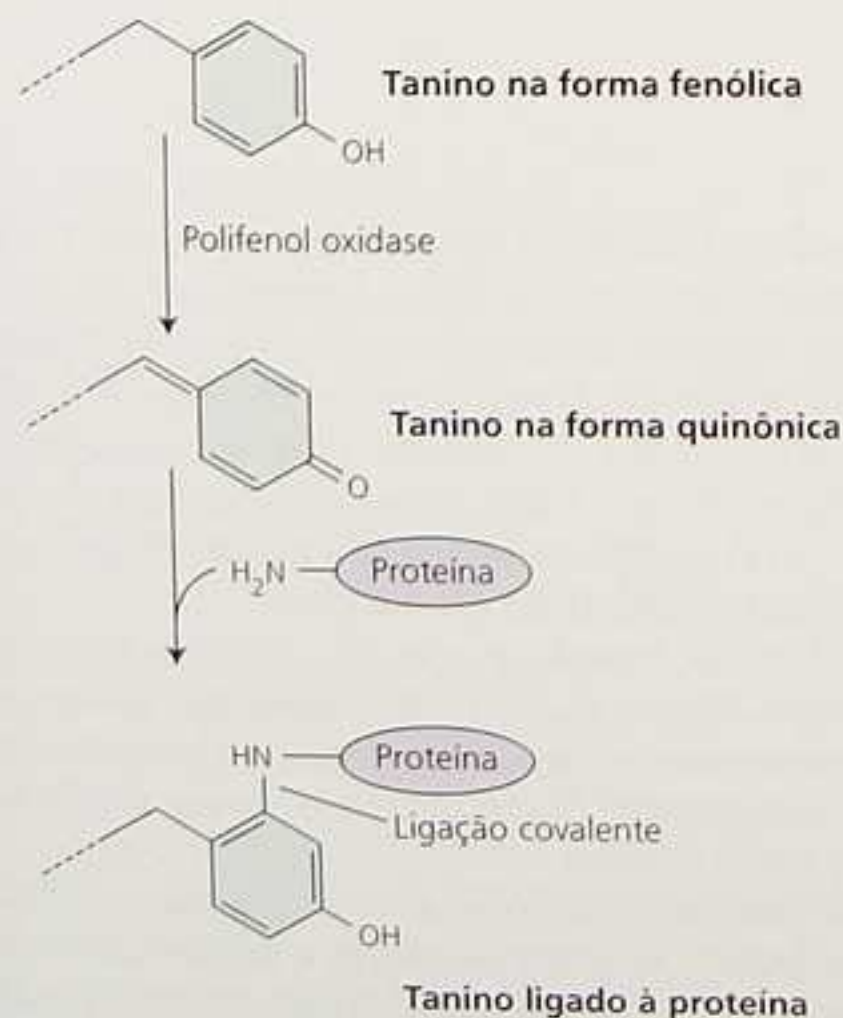



FIGURA 13.16 Mecanismos propostos para a interação de taninos com proteínas. (A) Pontes de hidrogênio podem se formar entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e os sítios eletronegativos da proteína. (B) Hidroxilas fenólicas podem se ligar covalentemente a proteínas, após a oxidação catalisada por enzimas, como, por exemplo, a polifenol oxidase.

Os herbívoros que habitualmente alimentam-se de plantas ricas em taninos parecem ter algumas adaptações interessantes para remover tais compostos dos seus sistemas digestórios. Por exemplo, alguns roedores e coelhos produzem, na saliva, proteínas com alto teor de prolina (25 a 45%), as quais apresentam grande afinidade pelos taninos. A secreção dessas proteínas é induzida pela ingestão de alimento ricos em tanino, diminuindo seus efeitos tóxicos (Butler, 1989). O grande número de resíduos de prolina confere a essas proteínas uma conformação aberta e muito flexível e um elevado grau de hidrofobicidade, o que facilita sua ligação aos taninos.

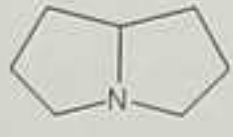
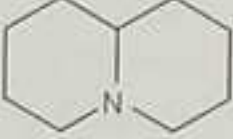
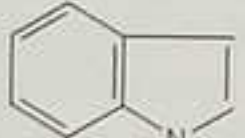
Os taninos vegetais também servem como defesa ao ataque de microrganismos. Por exemplo, o cerne de muitas árvores contém altas concentrações de taninos, os quais auxiliam na prevenção da decomposição por fungos e bactérias.

COMPOSTOS NITROGENADOS

Uma grande variedade de metabólitos secundários vegetais possui nitrogênio na sua estrutura. Incluindo-se nessa categoria alguns compostos bem conhecidos na defesa das plantas contra a herbivoria, como os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos, por exemplo, os quais são de considerável interesse, devido ao seu efeito tóxico para humanos e às suas propriedades medicinais. Muitos metabólitos secundários nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos comuns.

Nesta seção, será examinada a estrutura e as propriedades biológicas de vários metabólitos secundários nitrogenados, incluindo alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos e aminoácidos não-protéicos. Além disso, será discutida a capacidade da *sistemina*, uma proteína liberada por células lesadas, ao agir como um sinalizador de danos para o resto da planta.

Os alcalóides provocam efeitos fisiológicos drásticos nos animais

Os **alcalóides** constituem uma grande família com mais de 15.000 metabólitos secundários nitrogenados, encontrados em, aproximadamente, 20% das espécies de plantas vasculares. Em geral, nessas substâncias, o átomo de nitrogênio faz parte do **anel heterocíclico**, estrutura que possui átomos de nitrogênio e carbono. Como grupo, os alcalóides são bem conhecidos pelos seus importantes efeitos farmacológicos em animais vertebrados.

Como o nome sugere, muitos alcalóides são alcalinos. Em valores de pH encontrados no citosol (pH 7,2) ou nos vacúolos (pH 5 a 6), o átomo de nitrogênio está protonado; então, os alcalóides são carregados positivamente, sendo, geralmente, solúveis em água.

Os alcalóides são, via de regra, sintetizados a partir de um ou poucos aminoácidos comuns — sobretudo lisina, tirosina e triptofano. Contudo, o esqueleto de carbono de alguns alcalóides apresenta um componente derivado da rota dos terpenos. A Tabela 13.2 exibe os principais tipos de alcalóides e seus aminoácidos precursores. Vários tipos diferentes, incluindo nicotina e seus compostos relacionados (Figura 13.17), são derivados da ornitina, uma molécula intermediária na biossíntese da arginina. O ácido nicotínico (niancina), vitamina B, é um precursor do anel piridínico (seis membros) da nicotina; o anel pirrolidínico (cinco membros) desse alcalóide tem origem na ornitina (Figura 13.18). O ácido nicotínico é também um constituinte do NAD^+ e do

TABELA 13.2
Principais tipos de alcalóides, seus aminoácidos precursores e exemplos conhecidos de cada tipo

Classe de alcalóide	Estrutura	Precursor biossintético	Exemplos	Usos em humanos
Pirrolidínico	N	Ornitina (aspartarto)	Nicotina	Estimulante, sedativo, tranqüilizante
Tropânico	N	Ornitina	Atropina	Prevenção contra espasmos intestinais, antídoto contra outros venenos, dilatação de pupilas para exames oftalmológicos
			Cocaína	Estimulante do sistema nervoso central, anestésico local
Piperidínico	N	Lisina (ou acetato)	Coniína	Veneno (paralisa os neurônios motores)
Pirrolizidínico	N	Ornitina	Retrorsina	Nenhum
Quinolizidínico	N	Lisina	Lupinina	Restabelecimento do ritmo cardíaco
Isoquinolínico	N	Tirosina	Codeína	Analgésico (alívio de dores, antitussígeno)
			Morfina	Analgésico
Indólico	N	Triptofano	Psilocibina	Alucinógeno
			Reserpina	Tratamento de hipertensão, tratamento de psicoses
			Estricnina	Veneno para ratos, tratamento para distúrbios oculares

NADP$^+$, os quais agem como transportadores de elétrons no metabolismo.

O papel dos alcalóides nos vegetais tem sido objeto de especulação há pelo menos, 100 anos. Acreditava-se que os alcalóides eram compostos nitrogenados destinados à excreção (semelhante à uréia e ao ácido úrico nos animais), compostos que armazenavam nitrogênio ou reguladores de crescimento, mas existem poucas evidências que sustentem qualquer uma dessas funções. Acredita-se que a maior parte dos alcalóides funcione como defesa contra predadores, em especial mamíferos, devido à sua toxicidade geral e à capacidade de deterrência (Hartmann, 1982).

Grande parte das mortes do gado tem como causa a ingestão de plantas contendo alcalóides. Nos Estados Unidos, a cada ano, uma percentagem significativa dos rebanhos é envenenada pelo consumo de grande quantidade de plantas que contêm alcalóides, como tremoço (*Lupinus*), espora-do-Colorado (*Delphinium*) e senécio (*Senecio*). Tal fenômeno pode ser devido ao fato de que animais domesticados, ao contrário dos animais selvagens, não estiveram sujeitos à seleção natural para evitar as plantas tóxicas.

Na realidade, alguns animais domesticados parecem preferir plantas que tenham alcalóides para diminuir o efeito nocivo da pastagem. Praticamente, todos os alcalóides são tóxicos para humanos, quando ingeridos em quantidades suficientes. Por exemplo, a estricnina, a atropina e a coniína (venenos obtidos da cicuta) são alcalóides clássicos utilizados como venenos. Entretanto, em baixas doses, muitos são farmacologicamente úteis. A morfina, a codeína e a escopolamina são exemplos de alcalóides vegetais usados na medicina. Outros, como a cocaína, a nicotina e a cafeína (ver Figura 13.17) desfrutam de um uso não-medicinal bastante difundindo, como estimulantes ou sedativos.

No nível celular, o modo de ação dos alcalóides em animais é bastante variado. Muitos alcalóides interagem com os componentes do sistema nervoso, em especial os transmissores químicos; outros afetam o transporte de membrana, a síntese protéica ou a atividade de várias enzimas.

Os alcalóides pirrolizidínicos constituem um exemplo de como os herbívoros podem se tornar adaptados a tolerar as substâncias de defesa das plantas e ainda utilizá-las em sua própria defesa (Hartmann, 1999). Nas plantas, os alcalóides pirrolizidínicos ocorrem naturalmente como N-óxidos não-tóxicos. No trato digestivo de herbívoros, contudo, eles são rapidamente reduzidos a alcalóides terciários hidrofóbicos não-carregados (Figura 13.19), os quais facilmente passam através das membranas e são tóxicos. No entanto, alguns herbívoros, como a mariposa *Tyria jacobeae*, desen-

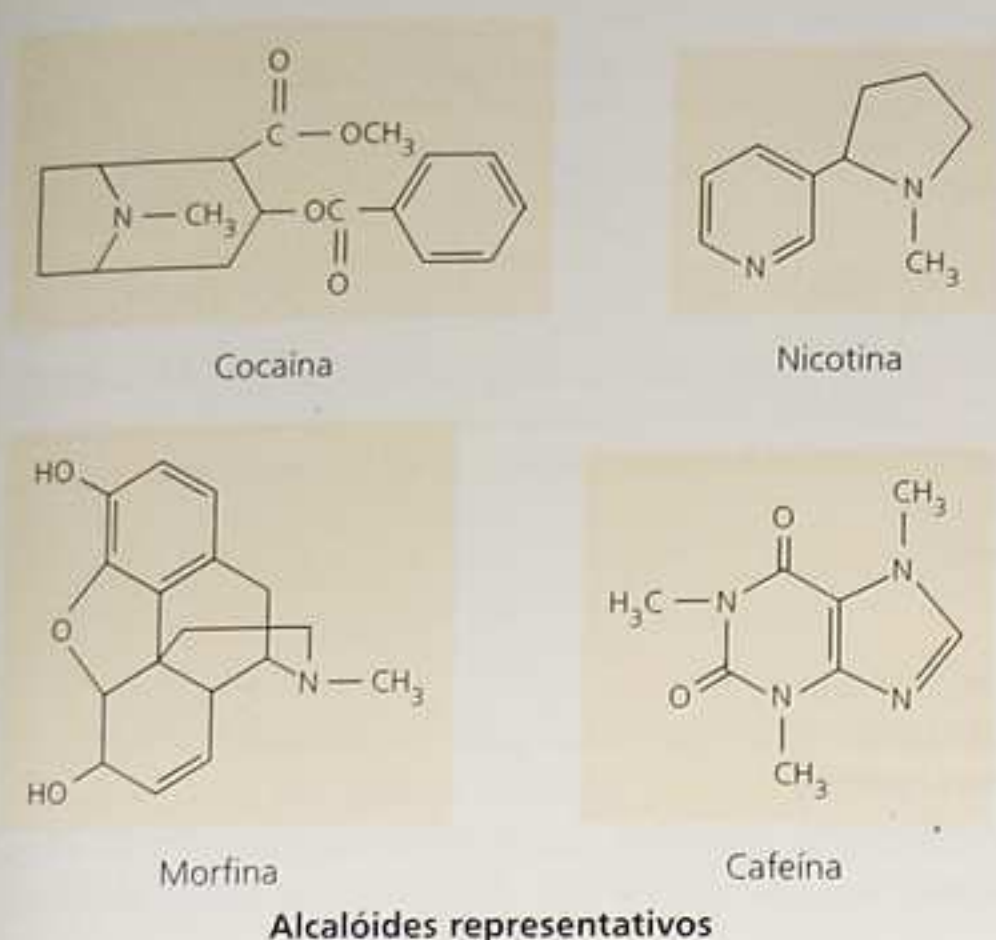
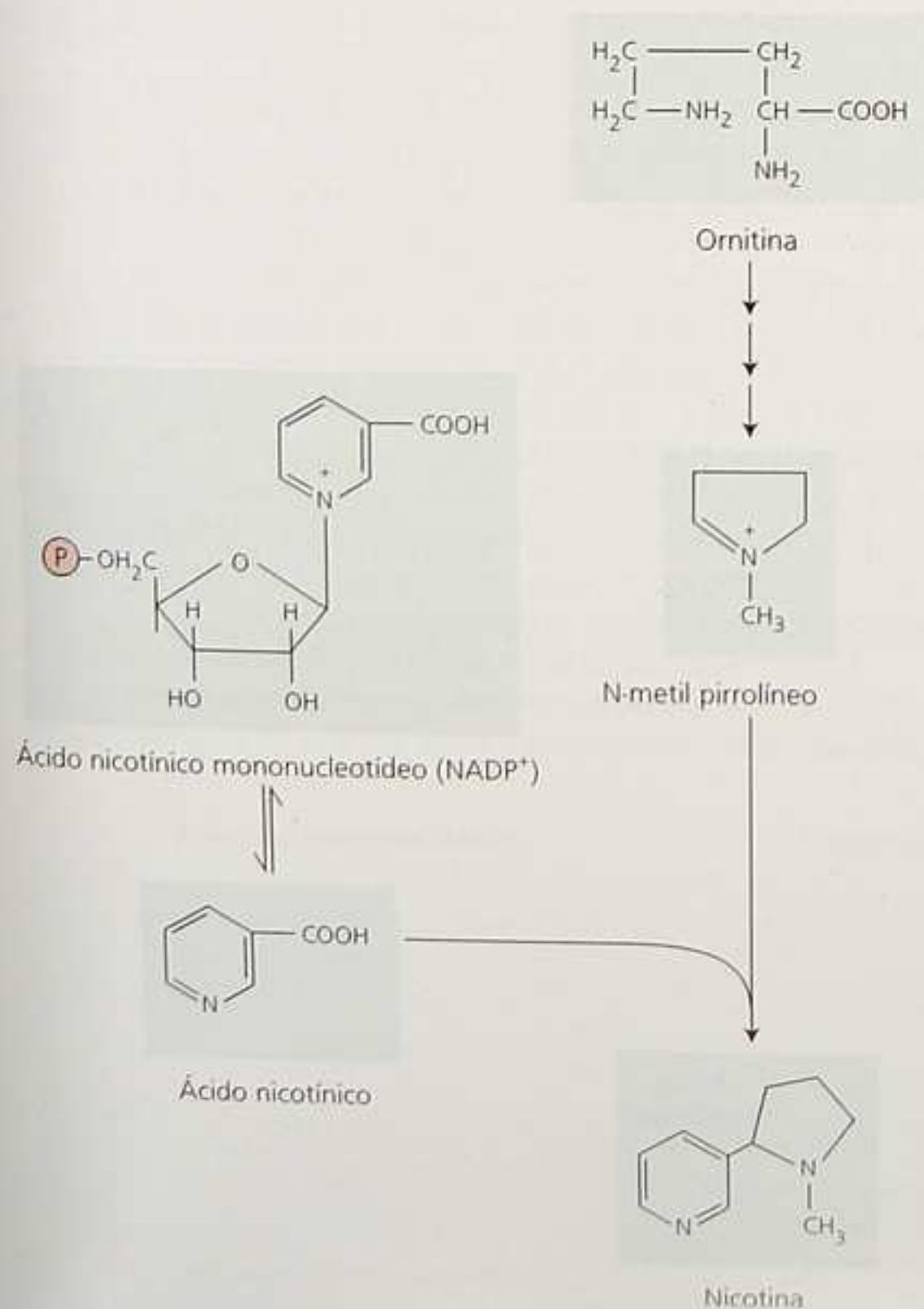



FIGURA 13.17 Exemplos de alcalóides, um grupo diversificado de metabólitos secundários que contêm nitrogênio, normalmente como parte do anel heterocíclico. A cafeína é um alcalóide do tipo purina, similar à adenina e à guanina, bases dos ácidos nucléicos. O anel pirrolidínico (cinco membros) da nicotina é derivado da ornitina; o anel piridínico (seis membros) é derivado do ácido nicotínico.

volveram a capacidade de reconverter o alcalóide terciário pirrolizidínico à forma N-óxido não-tóxico, imediatamente após a absorção no trato digestivo. Tais herbívoros podem, então, estocar os N-óxidos em seus corpos como defesa contra seus predadores.

Nem todos os alcalóides que ocorrem nos vegetais são produzidos pela própria planta. Muitas gramíneas abrigam fungos endógenos simbiontes que crescem no apoplasto e sintetizam uma grande variedade de alcalóides. Muitas vezes, essas plantas com fungos simbiontes crescem mais rápido e são menos suscetíveis aos insetos e mamíferos herbívoros do que aquelas sem os fungos simbiontes. Infelizmente, algumas gramíneas, tais como as do gênero *Festuca*, são espécies importantes utilizadas como pastagem, podendo, freqüentemente, se tornarem tóxicas aos animais quando seus alcalóides encontram-se em altas concentrações. Pesquisas estão em andamento no sentido de melhorar geneticamente essas espécies para que apresentem níveis de alcalóides não-tóxicos ao gado, mas que continuem protegendo contra os insetos (ver **Ensaios 13.2 da Internet**).

Assim como os monoterpenos presentes na resina de coníferas e muitos outros compostos de defesa contra herbívoros, os alcalóides aumentam em resposta ao dano inicial provocado pela herbivoria, fortalecendo a planta contra um ataque subseqüente (Karban e Baldwin, 1997). Por exemplo, em *Nicotiana attenuata*, uma espécie selvagem de tabaco encontrada nos desertos da Great Basin (Estados Unidos), produz altos níveis de nicotina após o ataque de um herbívoro. Entretanto, quando a planta é atacada por lagartas tolerantes à nicotina, não há aumento nos níveis desse alcalóide. Por outro lado, são liberados terpenos voláteis que atraem os inimigos naturais das lagartas. Evidentemente, as espécies selvagens de tabaco e de outras plantas devem possuir maneiras de determinar qual tipo de herbívoro é danoso à sua folhagem. Os herbívoros devem sinalizar sua presença pelo tipo de dano que causam ou pelos compostos químicos distintos que liberam. Recentemente, foi demonstrado que as secreções orais das lagartas alimentadas com folhas de milho continham um aminoácido conjugado com ácido graxo, que induzia a planta a produzir compostos terpênicos de defesa, quando aplicados a segmentos de folhas.

Os glicosídeos cianogênicos liberam o veneno ácido cianídrico

Além dos alcalóides, as plantas contêm outros compostos nitrogenados com função de proteção. Dois grupos dessas substâncias — glicosídeos cianogênicos e glucosinolatos — não são tóxicos como tal, mas rapidamente decompõem-se quando a planta é lesada, produzindo venenos voláteis. Os glicosídeos cianogênicos liberam o conhecido veneno gasoso, o ácido cianídrico (HCN).

A quebra dos glicosídeos cianogênicos nos vegetais consiste de um processo de duas etapas. As espécies que produzem glicosí-

FIGURA 13.18 A biossíntese da nicotina inicia com a síntese do ácido nicotínico (niancina) a partir do aspartato e do gliceraldeído-3-fosfato. O ácido nicotínico é também um componente do NAD^+ e $NADP^+$, participantes importantes nas reações biológicas de oxidação-redução. O anel de cinco membros da nicotina é derivado da ornitina, um intermediário da biossíntese da arginina.

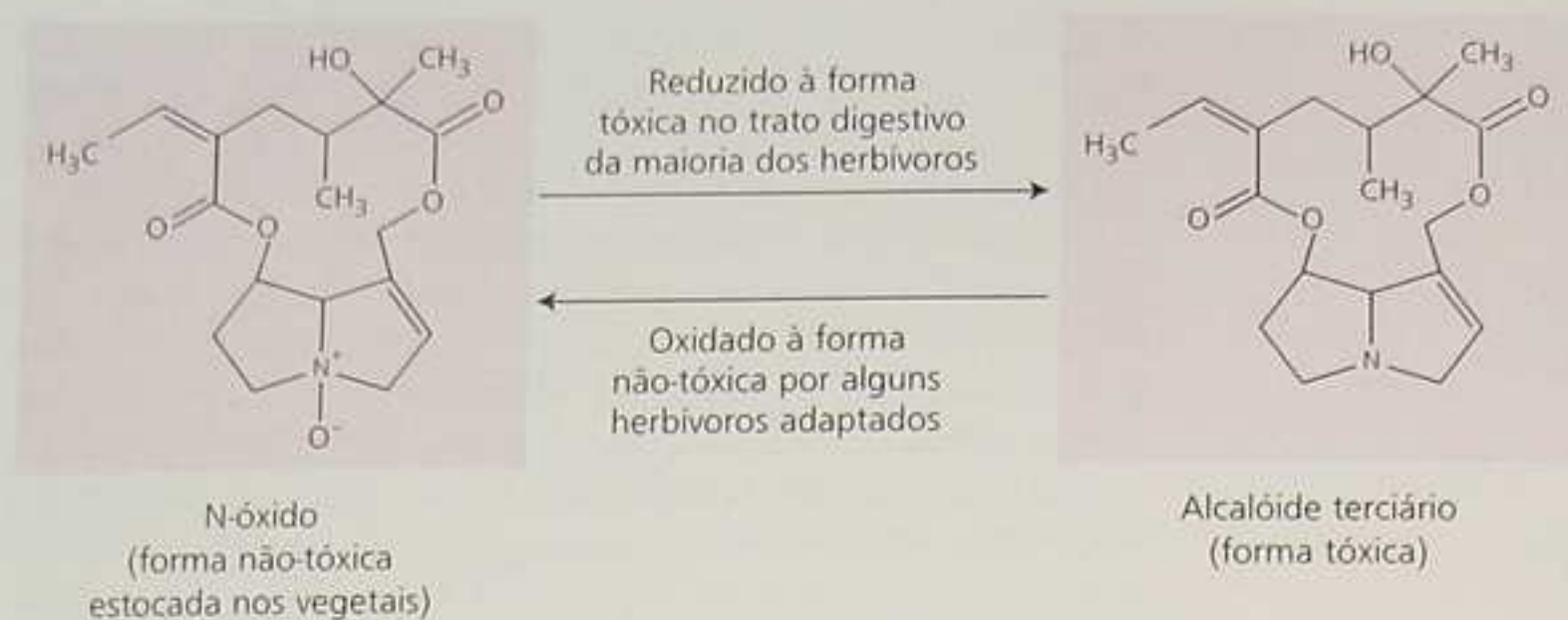



FIGURA 13.19 Duas formas de alcalóides pirrolizidínicos ocorrem na natureza: a forma N-óxido e o alcalóide terciário. O N-óxido não-tóxico encontrado nos vegetais é reduzido à forma tóxica terciária no trato digestivo da maioria dos herbívoros. Entretanto, alguns herbívoros adaptados podem converter o alcalóide terciário tóxico em N-óxido atóxico. Tais formas estão ilustradas aqui para o alcalóide senecionina, encontrado em senécio (*Senecio*).

deos cianogênicos também produzem as enzimas necessárias para hidrolisar o açúcar e liberar o HCN:

1. Na primeira etapa, o açúcar é clivado por uma glicosidase, uma enzima que separa açúcares de outras moléculas às quais eles estejam ligados (Figura 13.20).
2. Na segunda etapa, o produto resultante da hidrólise, chamado α-hidroxinitrila ou ciano-hidrina, pode se decompor lenta e espontaneamente para liberar HCN. Essa etapa pode ser acelerada pela enzima hidroxinitrila liase.

Normalmente, os glicosídeos cianogênicos não são clivados em plantas intactas, pois o glicosídeo e as enzimas de clivagem estão espacialmente separados, em compartimentos celulares diferentes ou, mesmo em tecidos distintos. Em sorgo, por exemplo, o glicosídeo cianogênico *dhurrin*, está presente no vacúolo das células epidérmicas, enquanto as enzimas hidrolíticas e líticas são encontradas no mesófilo (Poulton, 1990).

Sob condições regulares, essa compartimentalização impede a decomposição do glicosídeo. Porém, quando a folha é danificada, como durante a mastigação por um herbívoro, os conteúdos celulares de diferentes tecidos são misturados, formando HCN. Os glicosídeos cianogênicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e freqüentemente encontrados em leguminosas, gramíneas e espécies da família *Rosaceae*.

Várias evidências indicam que os glicosídeos cianogênicos apresentam função protetora em certos vegetais. O HCN é uma toxina de ação rápida, que inibe as metaloproteínas, como a fe-citocromo oxidase, uma enzima-chave no processo da respiração celular. A presença dos glicosídeos cianogênicos inibe a alimentação de insetos e outros herbívoros, tais como lesmas e caracóis. No entanto, assim como em outros grupos de metabólitos secundários, alguns herbívoros estão adaptados a se alimentar de plantas cianogênicas e toleram grandes doses de HCN.

Os tubérculos de mandioca (*Manihot esculenta*), um alimento rico em carboidratos e muito importante em vários países tropicais, contêm altos níveis de glicosídeos cianogênicos. Os métodos tradicionais de processamento, que envolvem os procedimentos de moagem, embebição e secagem, levam à remoção ou degradação de grande parte dos glicosídeos cianogênicos presentes nos tubérculos. Entretanto, o envenenamento crônico por cianeto, levando à paralisia parcial dos lábios ainda é bastante comum nas regiões onde a mandioca constitui a maior fonte de alimento, pois os métodos tradicionais empregados para a remoção dos compostos cianogênicos não são completamente eficientes. Além disso, muitas populações que consomem mandioca apresentam nutrição deficiente, o que agrava os efeitos desses compostos.

Inúmeras tentativas estão sendo empreendidas no sentido de reduzir o conteúdo de glicosídeos cianogênicos da mandioca, pelo melhoramento convencional e pelas técnicas de engenharia gené-

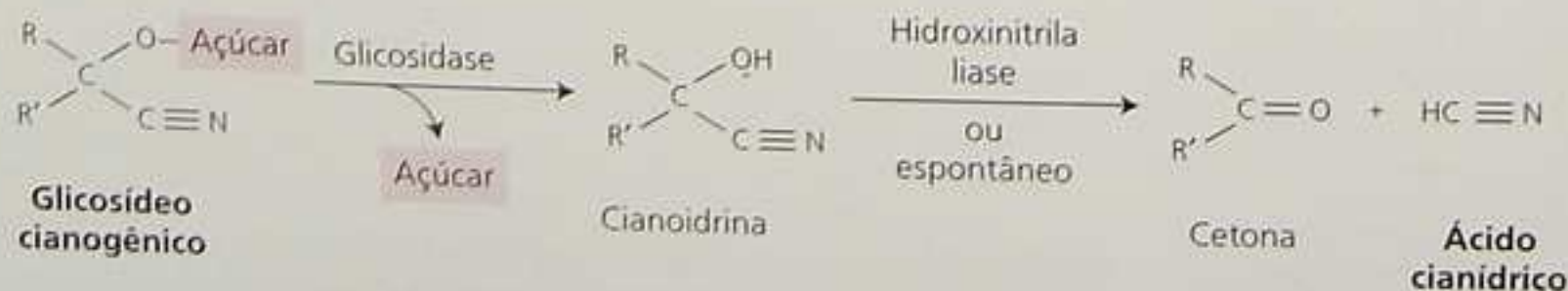



FIGURA 13.20 Hidrólise enzimática dos glicosídeos cianogênicos para liberar ácido cianídrico. R e R' representam vários substituintes alquila ou arila. Por exemplo, se R é fenil, R' é hidrogênio e o açúcar é um dissacarídeo β-gentiobiose, o composto é amigdalina (um glicosídeo cianogênico comum encontrado nas sementes de amêndoa, damasco, cereja e pêssego).

Glucosinolato → (Tioglicosidase; Glicose) → Aglicona → (Espontâneo; SO_4^{2-}) → Isotiocianato ($R—N=C=S$) / Nitrila ($R—C≡N$)

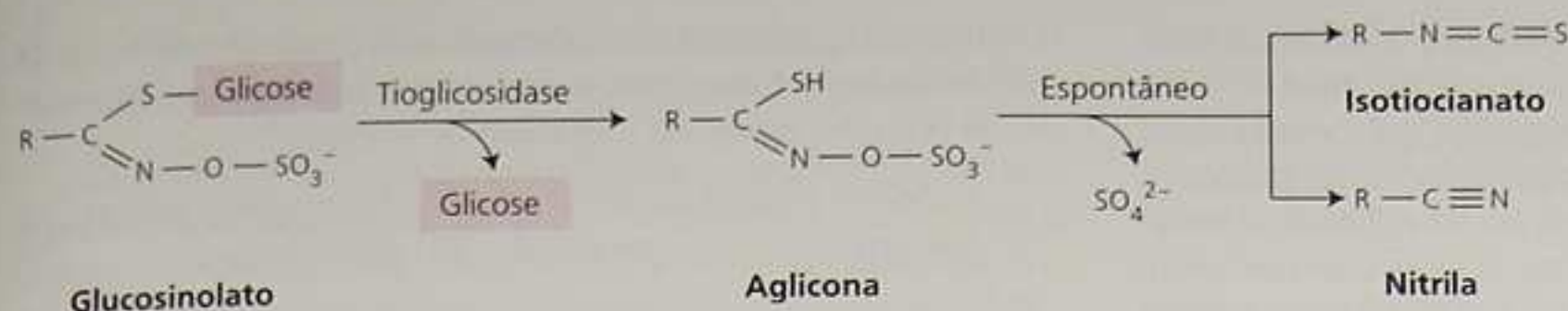



FIGURA 13.21 Hidrólise de glucosinolatos em compostos voláteis da mostarda. R representa vários substitutos alquila ou arila. Por exemplo, se R é $CH_2 = CH — CH_2^-$, o composto é sinigrina, o principal glicosinolato das sementes de mostarda-negra e raízes de *Armoracia* (raiz-forte).

tica. Porém, a eliminação completa de tais compostos pode não ser desejável, pois tais substâncias são provavelmente responsáveis pela propriedade que essa espécie apresenta de permitir a sua estocagem por longos períodos, sem ser atacada por pragas.

Os glucosinolatos liberam toxinas voláteis

Um segundo grupo de glicosídeos vegetais, os glucosinolatos, ou glicosídeos do óleo da mostarda, liberam, na sua decomposição, substâncias voláteis de defesa. Encontrados principalmente em *Brassicaceae* e famílias relacionadas, os glucosinolatos liberam os compostos responsáveis pelo odor e pelo gosto característico de vegetais como repolho, brócolis e rabanete.

A liberação desses compostos voláteis a partir dos glucosinolatos é catalisada por uma enzima hidrolítica denominada tioglicosidase ou mirosinase, que cliva a glicose na sua ligação com o átomo de enxofre (Figura 13.21). A aglicona resultante, sem açúcar, reorganiza-se com a perda do sulfato para originar produtos pungentes e quimicamente reativos, incluindo isotiocianatos e nitrilas, dependendo das condições de hidrólise. Esses produtos agem na defesa da planta, como toxinas e repelentes contra herbívoros. Como os glicosídeos cianogênicos, os glucosinolatos são armazenados na planta intacta separadamente das enzimas que os hidrolisam e são colocados em contato com tais enzimas somente quando a planta é lesada.

Assim como outros metabólitos secundários, alguns animais adaptaram-se à alimentação com plantas que contêm glucosinolatos, sem que haja efeitos danosos. Para os herbívoros adaptados, como, por exemplo, a borboleta do repolho, os glucosinolatos muitas vezes servem de estimulantes para alimentação e oviposição, enquanto os isotiocianatos produzidos após a hidrólise dos glucosinolatos agem como atrativos voláteis (Renwick e cols., 1992).

A maioria das pesquisas recentes em glucosinolatos como defesas vegetais tem sido concentrada em colza ou canola (*Brassica napus*), o principal cultivo para produção de óleo na América do Norte e Europa. Os melhoristas têm tentado diminuir os níveis de glucosinolatos nas sementes, de modo que o farelo altamente protéico, que permanece após a extração do óleo, possa servir como ração para animais. As primeiras variedades de canola contendo baixos níveis de glucosinolatos testadas em campo não sobreviveram devido a sérios problemas de infestação de pragas. Entretanto, variedades desenvolvidas mais recentemente, com níveis baixos desses compostos nas sementes e altos níveis nas folhas, são resistentes às pragas, além de fornecer um resíduo da semente rico em proteína para alimentação animal.

Os aminoácidos não-protéicos agem na defesa contra herbívoros

As plantas e os animais incorporam os mesmos 20 aminoácidos nas suas proteínas. Entretanto, muitas plantas contêm aminoácidos pouco comuns, chamados de **aminoácidos não-protéicos**, que não são incorporados em proteínas, mas que estão presentes na forma livre e atuam como substâncias protetoras. Eles são muitas vezes similares aos aminoácidos protéicos. A canavanina, por exemplo, é um análogo próximo da arginina e a azetidina-2-ácido carboxílico apresenta estrutura semelhante à da prolina (Figura 13.22).

Os aminoácidos não-protéicos exercem sua toxicidade de várias maneiras. Alguns bloqueiam a síntese ou a absorção de ami-

Aminoácidos não-protéicos: Canavanina ($HOOC—CH(NH_2)—CH_2—CH_2—O—NH—C(=NH)—NH_2$); Azetidina-2-ácido carboxílico

Análogos de aminoácidos protéicos: Arginina ($HOOC—CH(NH_2)—CH_2—CH_2—CH_2—NH—C(=NH)—NH_2$); Prolina

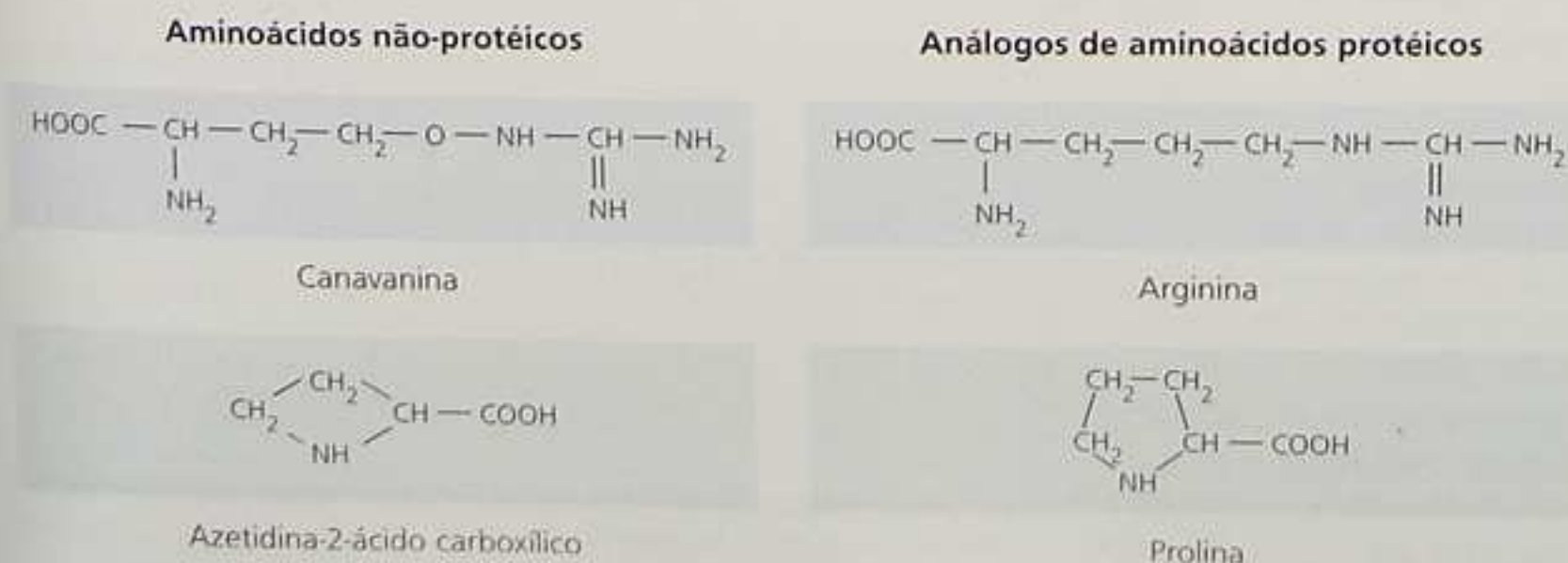



FIGURA 13.22 Aminoácidos não-protéicos e seus aminoácidos protéicos análogos. Os aminoácidos não-protéicos não são incorporados em proteínas, mas são compostos de defesa encontrados na forma livre nas células vegetais.

noácidos protéicos; outros, como a canavanina, podem ser erroneamente incorporados às proteínas. Após a ingestão pelo herbívoro, a canavanina é reconhecida por uma enzima que normalmente liga a arginina à molécula de RNA transportador desse aminoácido, assim incorporando a canavanina em vez da arginina. O resultado desse processo é a produção de uma enzima não-funcional, pois a sua estrutura terciária ou seu sítio catalítico é desorganizado. A canavanina é menos básica do que a arginina e pode alterar a capacidade de ligação de uma enzima ao substrato ou de catalisar reações químicas (Rosenthal, 1991).

Os vegetais que sintetizam aminoácidos não-protéicos não são suscetíveis à toxicidade desses compostos. As sementes de *Canavalia ensiformis*, que sintetizam grandes quantidades de aminoácidos não-protéicos, apresentam uma maquinaria de síntese protéica, que pode distinguir entre a arginina e a canavanina, não incorporando esta última nas suas proteínas. Alguns insetos que se especializaram em plantas que contêm aminoácidos não-protéicos apresentam adaptações bioquímicas semelhantes.

Algumas proteínas vegetais inibem a digestão em herbívoros

Entre os diversos componentes do arsenal de defesa das plantas destacam-se as proteínas que interferem no processo digestivo dos herbívoros. Por exemplo, algumas leguminosas sintetizam inibidores de α-amilase, que inibem a ação dessa enzima e, por conseqüência, a digestão do amido. Outras espécies produzem **lectinas**, proteínas de defesa que se ligam a carboidratos ou a glicoproteínas. Após ser ingerida por um herbívoro, a lectina liga-se às células epiteliais que revestem o trato digestivo e interfere na absorção de nutrientes (Peumans e Van Damme, 1995).

As proteínas antidigestivas mais conhecidas nos vegetais são os inibidores de proteases. Encontradas nos legumes, no tomate e em outros vegetais, tais substâncias bloqueiam a ação das enzimas proteolíticas dos herbívoros. Estando no trato digestivo desses animais, elas se ligam especificamente ao sítio ativo de enzimas proteolíticas, como tripsina e quimotripsina, impedindo a digestão das proteínas. Os insetos que se alimentam de plantas que contêm inibidores de proteases apresentam taxas reduzidas de crescimento e desenvolvimento, processos que podem ser compensados pela suplementação de aminoácidos à sua dieta.

A função dos inibidores de protease na defesa vegetal tem sido confirmada por experimentos com tabaco transgênico. As plantas geneticamente transformadas para acumular níveis elevados de inibidores de proteases sofrem menos danos com o ataque de insetos herbívoros do que as plantas-controle, não-transformadas (Johnson e cols., 1989).

O dano causado pelos herbívoros desencadeia uma complexa rota de sinalização

Os inibidores de protease e algumas outras defesas não estão continuamente presentes nas plantas, sendo sintetizados somente após o ataque inicial de um herbívoro ou patógeno. No tomateiro, o ataque de um inseto leva a um rápido acúmulo de inibidores de protease em toda a planta, mesmo em áreas não-danificadas, distantes do local do ataque. A produção sistêmica de inibidores de proteases nas plantas jovens de tomateiro é desencadeada por uma complexa seqüência de eventos:

1. As folhas lesadas de tomateiro sintetizam **prosistemina**, um precursor protéico que contém 200 aminoácidos.
2. A prosistemina é processada proteoliticamente e produz um pequeno polipeptídeo (18 aminoácidos) chamado de **sistemina**, o primeiro (e, até então, único) polipeptídio com ação hormonal descoberto em plantas (Pearce e cols., 1991) (Figura 13.23).
3. A sistemina é liberada no apoplasto pelas células danificadas.
4. A sistemina é, então, transportada da folha danificada, através do floema.
5. Nas células-alvo, acredita-se que a sistemina ligue-se a um sítio na membrana plasmática e inicie a biossíntese do **ácido jasmônico**, um regulador de crescimento, que apresenta efeitos bastante variados (Creelman e Mullet, 1997).
6. Eventualmente, o ácido jasmônico ativa a expressão de genes que codificam os inibidores de protease (ver Figura 13.23). Outros sinais, como ABA (ácido abscísico), ácido salicílico e fragmentos de pectina de paredes celulares danificadas, também parecem participar nessa cascata de sinalização desencadeada pelo ferimento, porém suas ações específicas ainda não estão claras.

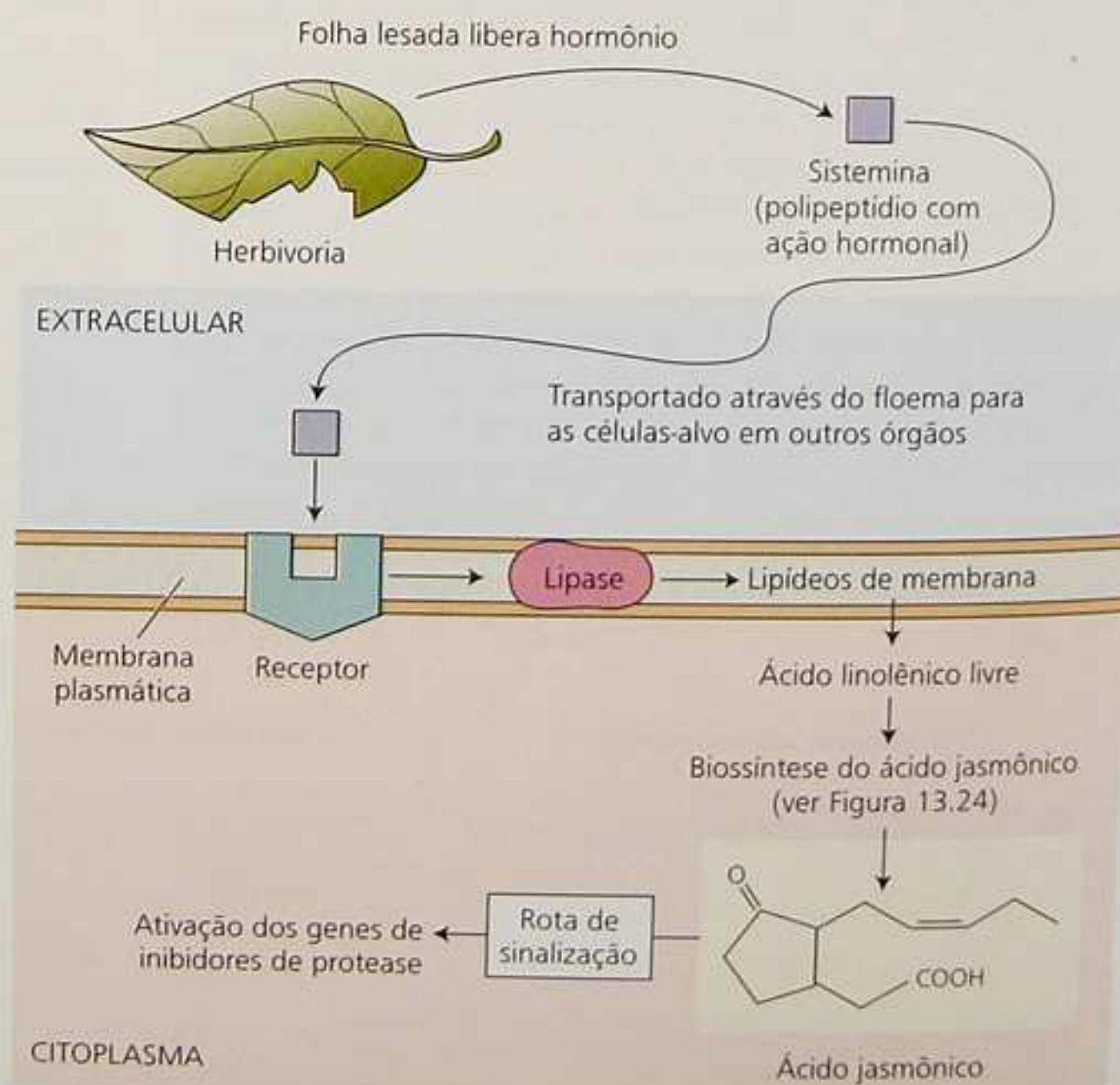



FIGURA 13.23 Rota de sinalização proposta para a rápida indução da biossíntese de inibidor de protease em plantas lesadas de tomateiro.

O ácido jasmônico é um hormônio relacionado ao estresse vegetal que ativa muitas respostas de defesa

Os níveis de ácido jasmônico aumentam rapidamente em resposta ao dano causado por diferentes herbívoros e desencadeia a formação de muitos tipos diferentes de defesas vegetais, além dos inibidores de protease, incluindo terpenos e alcalóides. A estrutura e a biossíntese do ácido jasmônico têm intrigado os botânicos, devido à semelhança com alguns eicosanóides, os quais são os centros das repostas inflamatórias e de outros processos fisiológicos em mamíferos (ver **Capítulo 14 na Internet**). Em vegetais, o ácido jasmônico é sintetizado a partir do ácido linolênico (18:3), o qual é liberado dos lipídeos da membrana plasmática e, então, convertido em ácido jasmônico, conforme ilustrado na Figura 13.24.

O ácido jasmônico induz a transcrição de muitos genes envolvidos no metabolismo de defesa vegetal. Os mecanismos dessa ativação gênica estão sendo esclarecidos. Por exemplo, pesquisas recentes em vinca (*Catharanthus roseus*), espécie que produz valiosos alcalóides anticancerígenos, identificaram um fator de transcrição que responde ao ácido jasmônico, ativando a expressão de vários genes que codificam enzimas da rota biossintética dos alcalóides (van der Fits e Memelink, 2000). Esse fator de transcrição também ativa os genes de certas rotas metabólicas primárias, que fornecem precursores para a formação de alcalóides, parecendo ser um regulador-mestre do metabolismo dessa espécie.

A demonstração direta da ação do ácido jasmônico na resistência a insetos tem sido resultado de pesquisas em linhagens mutantes de *Arabidopsis*, que produzem baixos níveis de ácido jasmônico (McConn e cols., 1997). Tais mutantes são mortos com facilidade por insetos praga, que normalmente não danificam *Arabidopsis*. Entretanto, a aplicação de ácido jasmônico exógeno pode restabelecer a resistência em níveis próximos aos observados nas plantas selvagens (não-mutantes).

COOH

Ácido linolênico

COOH

Ácido12-oxofitodienóico

COOH

Ácido jasmônico

FIGURA 13.24 Etapas na rota de conversão do ácido linolênico (18:3) em ácido jasmônico.

DEFESAS VEGETAIS CONTRA PATÓGENOS

Embora os vegetais não apresentem um sistema imunológico, eles são surpreendentemente resistentes a doenças provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides que estão sempre presentes no ambiente. Nesta seção, serão examinados os diversos mecanismos que os vegetais têm evolutivamente desenvolvido para resistir à infecção, incluindo a produção de agentes antimicrobianos e um tipo de morte celular programada (ver Capítulo 16) chamado de *resposta de hipersensibilidade*. Por último, discutir-se-á um tipo especial de imunidade vegetal, denominado *resistência sistêmica adquirida*.

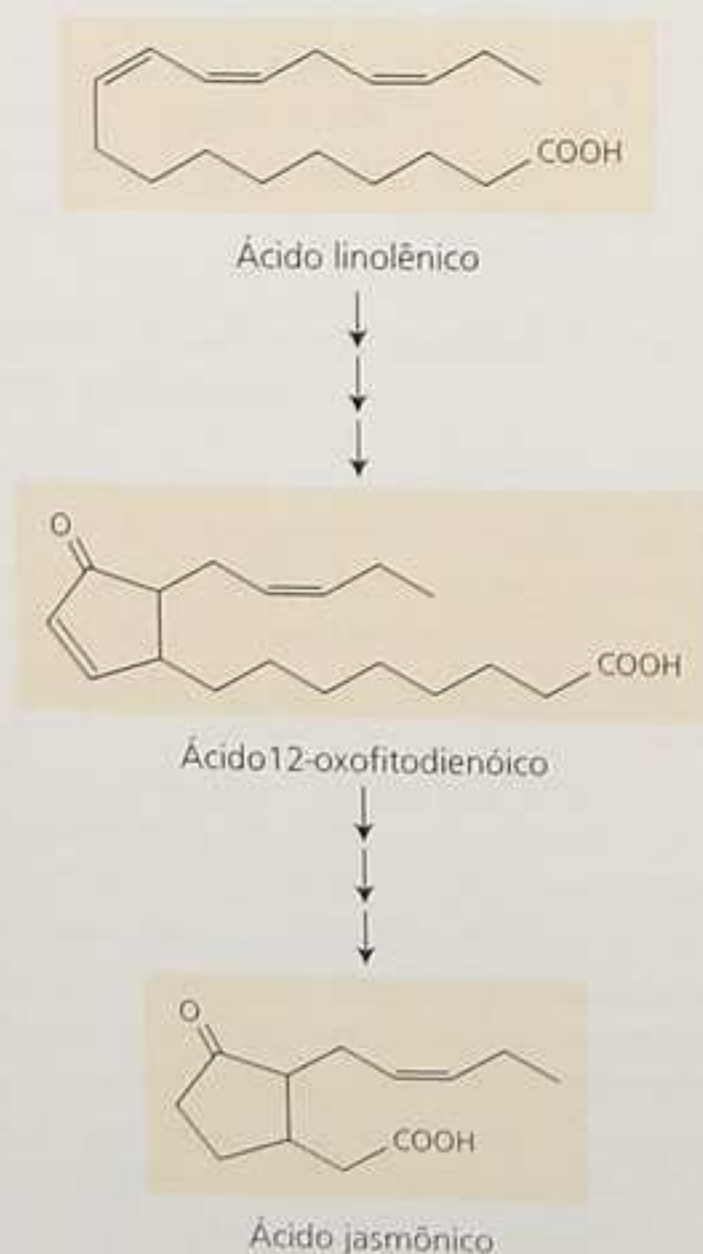
Alguns compostos antimicrobianos são sintetizados antes do ataque do patógeno

Várias classes de metabólitos secundários que foram discutidas apresentam alta atividade antimicrobiana, quando testados *in vitro*; assim tem sido proposto que tais compostos atuem como defesas contra patógenos nas plantas intactas, destacando-se as saponinas, um grupo de terpenos que, aparentemente, rompem as membranas celulares de fungos por ligação com esteróis.

Os experimentos realizados no Laboratório de Anne Osbourn, no John Innes Centre (Norwich, Inglaterra) utilizaram abordagens genéticas para demonstrar o papel das saponinas na defesa contra os patógenos da aveia (Papadopoulou e cols., 1999). Linhagens mutantes de aveia, com níveis reduzidos de saponina, foram menos resistentes a fungos do que as linhagens selvagens. Curiosamente, uma raça de fungo que normalmente se desenvolve em aveia foi capaz de destoxificar uma das principais saponinas na planta. Entretanto, os mutantes dessa raça, que não eram capazes de destoxificar essa saponina, não conseguiram infectar a aveia, mas puderam crescer em plantas de trigo que não continham saponina.

A infecção induz defesas adicionais contra patógenos

Algumas defesas são induzidas pelo ataque de herbívoros ou pela infecção por microrganismos. Teoricamente, as defesas que são produzidas a partir do dano inicial causado pelo herbívoro demandam um investimento menor dos recursos da planta do que aquelas que estão sempre presentes, mas que devem ser ativadas para sua efetividade. Assim como os inibidores de proteases, outras defesas induzidas parecem ser desencadeadas por redes complexas de transdução de sinal, as quais freqüentemente envolvem o ácido jasmônico.

Após ser infectada por um patógeno, a planta disponibiliza um amplo espectro de defesas contra o microrganismo invasor. Uma defesa comum é a **resposta de hipersensibilidade**, na qual as células adjacentes ao local de infecção morrem rapidamente, privando o patógeno de nutrientes e impedindo a sua propagação. Se a resposta de hipersensibilidade tiver sucesso, uma pequena região do tecido morto permanece no local do ataque do patógeno, mas o restante da planta não é afetado.

Este tipo de resposta é, muitas vezes, precedido pela produção de **espécies reativas de oxigênio.** As células vizinhas do local de infecção sintetizam uma variedade de compostos tóxicos formados pela redução do oxigênio molecular, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). Acredita-se que uma oxidase NADPH-dependente localizada na membrana plasmática (Figura 13.25) produza $O_2^{\bullet-}$, o qual é convertido em $\bullet OH$ e H_2O_2.

O radical hidroxila é o oxidante mais forte dessas espécies ativas de oxigênio e pode iniciar reações de radicais em cadeia, com várias moléculas orgânicas, levando à peroxidação lipídica, à inativação de enzimas e à degradação de ácidos nucléicos (Lamb e Dixon, 1997). As espécies ativas de oxigênio podem contribuir para a morte celular como parte da resposta de hipersensibilidade ou agir diretamente na morte do patógeno.

Muitas espécies reagem à invasão de fungos ou bactérias sintetizando lignina ou calose (ver Capítulo 10). Acredita-se que esses polímeros sirvam como barreiras, separando tais patógenos do resto da planta e bloqueando fisicamente a sua propagação. Uma das respostas de defesa é a modificação das proteínas da parede celular. Algumas proteínas da parede, ricas em prolina, formam ligações cruzadas após o ataque do patógeno, em uma reação de oxidação mediada por H_2O_2 (ver Figura 13.25) (Bradley e cols., 1992), processo que fortalece as paredes celulares das células próximas ao local da infecção, aumentando sua resistência à digestão pelo microrganismo.

Outra resposta de defesa à infecção é a formação de enzimas hidrolíticas que atacam a parede celular do fungo, que é composta por quitina, um polímero de resíduos de *N*-acetilglicosamina. Várias glucanases, quitinases e outras hidrolases são induzidas pela invasão do fungo. Essas enzimas hidrolíticas pertencem ao grupo de proteínas relacionadas à infecção do patógeno, conhecidas como **proteínas relacionadas à patogênese (PR).**

Fitoalexinas. Talvez a resposta de defesa a patógenos mais bem estudada nas plantas seja a síntese de **fitoalexinas,** as quais constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diverso, que se acumulam em torno do local de infecção e apresentam atividade antimicrobiana.

A produção de fitoalexinas parece ser um mecanismo comum de resistência a microrganismos patogênicos em uma grande variedade de plantas. Entretanto, diferentes famílias botânicas usam distintos produtos secundários como fitoalexinas. Por exemplo, os isoflavonóides são fitoalexinas comuns em leguminosas, enquanto que em plantas da família *Solanaceae*, como batata, tabaco e tomate, vários sesquiterpenos são produzidos como fitoalexinas (Figura 13.26).

Em geral, as fitoalexinas não estão presentes nas plantas antes da infecção, mas são sintetizadas muito rapidamente após o ataque do microrganismo, devido à ativação de novas rotas biossintéticas. O ponto de controle é o início do processo de transcrição do gene. Assim, parece que as plantas não armazenam qualquer maquinaria enzimática para a síntese de fitoalexinas, sendo que, logo após a infecção do microrganismo, inicia-se a transcrição de RNAs mensageiros específicos e a sua tradução em enzimas correspondentes.

Embora as fitoalexinas acumulem-se em concentrações tóxicas aos patógenos em bioensaios, o significado desses compostos para a defesa da planta intacta não é completamente compreendido. Experimentos recentes com plantas geneticamente modificadas têm fornecido as primeiras evidências da função das fitoalexinas *in vivo*. Por exemplo, plantas de tabaco transformadas com um gene

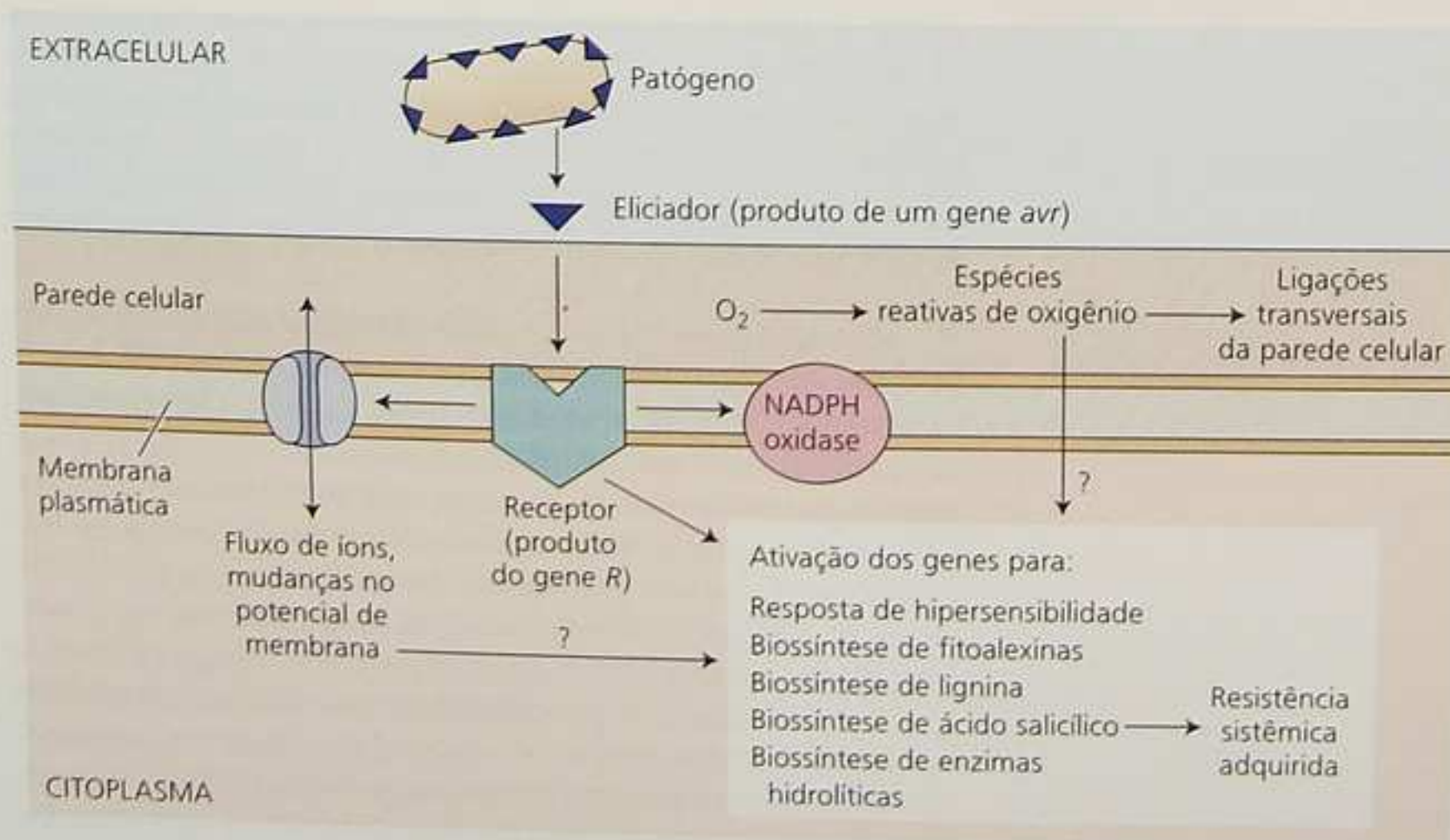



FIGURA 13.25 Muitas rotas de defesa contra patógenos são induzidas pela infecção. Os fragmentos de moléculas dos patógenos, denominadas eliciadores, iniciam uma complexa via de sinalização, que leva à ativação das respostas de defesa. Alguns eliciadores protéicos bacterianos são injetados diretamente na célula, onde interagem com os produtos do gene *R*.

Anel adicional formado por uma unidade C_5 a partir da rota dos terpenos

Medicarpina (da alfafa)

Gliceolina (da soja)

Isoflavonóides de leguminosas (família da ervilha)

Risitina (de batata e tomate)

Capsidiol (de pimenta e tabaco)

Sesquiterpenos de *Solanaceae* (família da batata)

FIGURA 13.26 Estrutura de algumas fitoalexinas — metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas, que são rapidamente sintetizados após a infecção pelo microrganismo.

que codifica a enzima responsável pela biossíntese do resveratrol (um fenilpropanóide com atividade de fitoalexina), tornaram-se mais resistentes a fungos do que as não-transformadas (Hain e cols., 1993). Por outro lado, mutantes de *Arabidopsis*, deficientes em camalexina, uma fitoalexina derivada do triptofano, foram mais suscetíveis a fungos patogênicos que o tipo selvagem. Em outros experimentos, os patógenos transformados com genes codificadores de enzimas de degradação de fitoalexinas foram, então, capazes de infectar plantas normalmente resistentes a eles (Kombrink e Somssich, 1995).

Alguns vegetais reconhecem substâncias específicas liberadas por patógenos

Muitas vezes, dentro da espécie, algumas plantas diferem quanto à resistência a patógenos microbianos. Tais diferenças freqüentemente dizem respeito à velocidade e à intensidade das reações da planta. Plantas resistentes respondem mais rápida e vigorosamente aos patógenos do que aquelas suscetíveis. Assim, é importante conhecer por quais mecanismos os vegetais percebem a presença dos patógenos e iniciam sua defesa.

Nos últimos anos, os pesquisadores isolaram mais de 20 genes diferentes relacionados à resistência vegetal, conhecidos como genes *R*, os quais agem na defesa contra fungos, bactérias e nematóides. A maioria dos genes *R* codifica receptores protéicos, que reconhecem e se ligam a moléculas específicas derivadas dos patógenos. Essa ligação funciona como um alerta para a planta sobre a presença do patógeno (ver Figura 13.25). As moléculas específicas dos patógenos, reconhecidas pelas plantas, são referidas como **eliciadores** e incluem proteínas, peptídeos, esteróis e fragmentos de polissacarídeos provenientes da parede celular do patógeno, membrana externa ou por processo de secreção (Boller, 1995).

Quase todos os produtos dos genes *R* são proteínas com domínios ricos em leucina, repetidos várias vezes na seqüência de aminoácidos (ver **Capítulo 14 na Internet**). Tais domínios podem estar envolvidos na ligação do eliciador e no reconhecimento do patógeno. Além disso, o produto do gene *R* é capaz de iniciar rotas de sinalização, que ativam várias formas de defesa contra patógenos. Alguns genes *R* codificam um sítio de ligação de nucleotídeos que liga ATP ou GTP; outros codificam um domínio para proteína quinase (Young, 2000).

Os produtos dos genes *R* estão distribuídos em mais de um local na célula. Alguns parecem estar situados do lado de fora da membrana plasmática, onde poderiam rapidamente detectar os eliciadores; outros são citoplasmáticos e detectam tanto as moléculas do patógeno injetadas na célula quanto outras mudanças metabólicas indicadores de infecção do microrganismo. Os genes *R* constituem uma das maiores famílias gênicas nas plantas e estão freqüentemente agrupados no genoma. A estrutura desses arranjos pode auxiliar a gerar diversidade dos genes R, por promover a permuta entre segmentos de cromossomos.

Os estudos de doenças vegetais têm revelado padrões complexos de relações entre as plantas e as raças de patógenos. As espécies vegetais são geralmente suscetíveis ao ataque de determinadas raças, mas resistentes a outras. Acredita-se que essa especificidade seja determinante na interação entre os produtos dos genes *R* do hospedeiro e dos genes *avr* (de *avi*rulência) do patógeno, responsáveis pela síntese de eliciadores específicos. De acordo com as pesquisas recentes, o sucesso da resistência requer que o eliciador, um produto do gene *avr* do patógeno, seja rapidamente reconhecido pelo receptor da planta hospedeira, um produto dos genes *R*. Apesar do nome, os genes *avr* parecem codificar fatores que promovem a infecção.

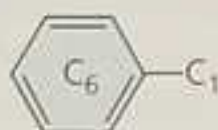
A exposição aos eliciadores induz uma cascata de transdução de sinal

Poucos minutos após os eliciadores do patógeno terem sido reconhecidos por um produto dos genes R, rotas complexas de sinalização são ativadas e eventualmente levam às respostas de defesa (ver Figura 13.25). Um elemento inicial comum dessas cascatas é a mudança transitória na permeabilidade iônica da membrana plasmática. A ativação do gene *R* estimula a entrada dos íons Ca^{+2} e H^+ na célula e a saída de K^+ e Cl^- (Nürnberger e Scheel, 2001). A entrada de Ca^{+2} na célula ativa as reações oxidativas que podem agir diretamente na defesa (conforme descrito anteriormente), bem como sinalizar outras reações de defesa. Ainda outros componentes das rotas de transdução de sinal ativados por patógenos incluem óxido nítrico, proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP), proteínas quinases dependentes de cálcio, ácidos jasmônico e salicílico (ver próxima seção).

Um único contato com o patógeno pode aumentar a resistência aos ataques futuros

Quando uma planta sobrevive ao ataque de um patógeno, muitas vezes mostra um aumento na sua resistência a ataques subseqüentes em qualquer outra região da planta e apresenta proteção contra uma grande variedade de espécies de patógenos. O fenômeno, chamado de **resistência sistêmica adquirida (SAR)** desenvolve-se após um período de vários dias depois da infecção inicial (Ryals e cols., 1996). A resistência sistêmica adquirida parece resultar dos níveis aumentados de certos compostos de defesa já mencionados, incluindo quitinases e outras enzimas hidrolíticas.

Embora os mecanismos de indução de SAR sejam ainda desconhecidos, um dos sinais endógenos é provavelmente o **ácido salicílico.** O nível desse derivado do ácido benzóico, um composto

C_6—C_1

aumenta drasticamente na região de infecção após o ataque inicial, estabelecendo a SAR em outras partes da planta, embora o ácido salicílico não seja ele próprio um sinal móvel (Figura 13.27).

Além do ácido salicílico, estudos recentes sugerem que seu éster metil, o metil salicilato, age como um sinal volátil, indutor da SAR, que é transmitido para partes distantes da planta e até para plantas adjacentes (Shulaev e cols., 1997). Assim, mesmo na ausência de um sistema imunológico, como aquele presente em muitos animais, as plantas desenvolveram mecanismos elaborados para se protegerem de microrganismos patogênicos.

FIGURA 13.27 A infecção inicial do patógeno pode aumentar a resistência a ataques futuros pelo desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida.

RESUMO

As plantas produzem uma enorme variedade de substâncias que não apresentam função aparente nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo, portanto, classificadas como metabólitos secundários. Os cientistas têm especulado que esses compostos protegem as plantas de predadores e patógenos com base na sua toxicidade e na capacidade de repelir herbívoros e microrganismos quando testados *in vitro*. Experimentos recentes em plantas que apresentam expressão alterada dos metabólitos secundários, por meio de técnicas de biologia molecular, têm permitido confirmar o papel de tais compostos na defesa vegetal.

Há três grupos principais de metabólitos secundários: os terpenos, os fenóis e os compostos nitrogenados. Os terpenos, formados por unidades isoprênicas de cinco carbonos, são toxinas e deterrentes para muitos herbívoros.

Os compostos fenólicos, sintetizados primeiramente a partir de produtos da rota do ácido chiquímico, desempenham várias funções importantes nas plantas. A lignina fortalece mecanicamente as paredes celulares. Os pigmentos flavonóides agem como uma proteção contra a radiação ultravioleta e como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes. Por último, a lignina, os flavonóides e outros compostos fenólicos atuam na defesa contra herbivoria e patógenos.

Os membros do terceiro grupo, os metabólitos secundários nitrogenados, são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos. Os compostos como alcalóides, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, aminoácidos não-protéicos e inibidores de proteases protegem as plantas contra vários herbívoros.

Ao longo da evolução, os vegetais desenvolveram múltiplos mecanismos de defesa contra patógenos microbianos. Além dos metabólitos secundários antimicrobianos, alguns dos quais são formados antes do ataque e outros, induzidos pela infecção, outros modos de defesa incluem a construção de barreiras de polímeros à penetração do patógeno e a síntese de enzimas que degradam a parede celular do patógeno. Além disso, os vegetais utilizam sistemas específicos de reconhecimento e sinalização permitindo a rápida detecção do patógeno e o início de uma resposta de defesa. Uma vez infectadas, algumas plantas desenvolvem imunidade aos ataques subseqüentes.

Por milhões de anos, os vegetais têm produzido defesas contra a herbivoria e o ataque de microrganismos. As plantas com sistemas de defesa eficientes tendem a deixar progênie maior do que aquelas que apresentam menor proteção, de modo que a capacidade de produzir compostos de defesa efetivos tem se tornado amplamente estabelecida no reino vegetal. Em resposta, muitas espécies de herbívoros e microrganismos têm desenvolvido a capacidade de se alimentar ou de infectar plantas que contenham metabólitos secundários sem serem afetados negativamente, pressão essa de herbívoros e patógenos que tem levado à seleção de novos produtos de defesa nos vegetais.

O estudo dos metabólitos secundários vegetais apresenta muitas aplicações práticas. Pelo valor da suas atividades biológicas contra herbívoros e microrganismos, muitas dessas substâncias são utilizadas comercialmente como inseticidas, fungicidas e medicamentos, enquanto outros são usados como fragrâncias, aromatizantes, drogas de uso medicinal e materiais industriais. O melhoramento de plantas cultivadas, quanto à produção de maiores níveis de produtos secundários, tem possibilitado a redução da necessidade de alguns pesticidas de altos custos e riscos. Entretan-

to, em alguns casos tem sido necessário reduzir os níveis de metabólitos secundários para minimizar a sua toxicidade a humanos e animais domésticos.

Material da Internet

Tópicos da Internet

13.1 Estrutura de vários triterpenos
São apresentadas as estruturas de vários triterpenos

13.2 Rota do ácido chiquímico
É apresentada a rota bioquímica para síntese de aminoácidos aromáticos, os precursores dos compostos fenólicos.

13.3 Estrutura química detalhada de uma porção da molécula de lignina
É descrita a estrutura parcial de uma molécula hipotética de lignina de faia (*Fagus silvatica*).

Ensaios da Internet

13.1 Esclarecimento sobre a função dos metabólitos secundários
Plantas selvagens de tabaco usam alcalóides e terpenos para defenderem-se contra herbívoros

13.2 Fungos simbiontes produtores de alcalóides
Os fungos endofíticos podem promover o crescimento vegetal, aumentar a resistência a vários tipos de estresse e agir como "mutualistas" na defesa contra herbívoros.

Referências bibliográficas

Aerts, R. J., and Mordue, A. J. (1997) Feeding deterrence and toxocity of neem triterpenoids. *J. Chem. Ecol.* 23: 2117-2132.

Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46: 189-214.

Bradley D. J., Kjellbom, P, and Lamb, C. J. (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: A novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.

Butler, L. G. (1989) Effects of condensed tannin on animal nutrition. In *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, R. W. Hemingway and J. J. Karchesy, eds., Plenum, New York, pp. 391-402.

Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Viseu dos Santos, A. C., Wood, E. G., and Carrier, M. J. (2001) Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 414: 863--864.

Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1997) Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mal. Biol.* 48: 355-381.

Davin, L. B., and Lewis, N. G. (2000) Dirigent proteins and dirigent sites explain the mystery of specificity of radical precursor coupling in lignan and lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* 123: 453-461.

Eigenbrode, S. D., Stoner, K. A., Shelton, A. M., and Kain, W. C. (1991) Characteristics of glossy leaf waxes associated with resistance to diamond-back moth (Lepidoptera: Plutellidae) in *Brassica oleracea*. *J. Econ. Entomol.* 83: 1609-1618.

Felton, G. W., Donato, K., Del Vecchio, R. J., and Duffey S. S. (1989) Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *J. Chem. Ecol.* 15:2667-2694.

Gershenzon, J., and Croteau, R. (1992) Terpenoids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Vol. 1: The Chemical Participants*, 2nd ed., G. A. Rosenthal and M. R. Berenbaum, eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 165-219.

Gunning, B. E. S., and Steer, M. W. (1996) *Plant Cell Biology: Structure and Function of Plant Cells*. Jones and Bartlett, Boston.

Hain, R., Reif, H.-J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P H., Stoecker, R. H., and Stenzel, K. (1993) Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361: 153-156.

Hartmann, T. (1992) Alkaloids. In *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, Vol. 1: The Chemical Participants*, 2nd ed., G. A. Rosenthal and M. R. Berenbaum, eds., Academic Press, San Diego, CA, pp. 79-121.

Hartmann, T. (1999) Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta* 207: 483-495.

Hatfield, R., and Vermerris, W (2001) Lignin formation in plants. The dilemma of linkage specificity. *Plant Physiol.* 126: 1351-1357.

Herrmann, K. M., and Weaver, L. M. (1999) The shikimate pathway *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 473-503.

Inderjit, Dakshini, K. M. M., and Einhellig, F. A., eds. (1995) *Allelopathy: Organisms, Processes, and Applications*. ACS Symposium series American Chemical Society, Washington, DC.

Jeffree, C. E. (1996) Structure and ontogeny of plant cuticles. In *Plant Cuticles: An Integrated Functional Approach*, G. Kerstiens, ed., BIOS Scientific, Oxford, pp. 33--85.

Jin, H., and Martin, C. (1999) Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Mol. Biol.* 41: 577-585.

Johnson, R., Narvaez, J., An, G., and Ryan, C. (1989) Expression of proteinase inhibitors I and 11 in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9871-9875.

Karban, R., and Baldwin, I. T. (1997) *Induced Responses to Herbivory*. University of Chicago Press, Chicago.

Kessler, A., and Baldwin, 1. T. (2001) Defensive function of herbivoreinduced plant volatile emissions in nature. *Science* 291: 2141-2144.

Kombrink E., and Somssich,1. E. (1995) Defense responses of plants to pathogens. *Adv. Bot. Res.* 21: 1-34.

Kondo, T., Yoshida, K., Nakagawa, A., Kawai, T., Tamura, H., and Goto, T, (1992) Structural basis of blue-color development in flower petals from *Commelina communis*. *Nature* 358: 515-518.

Lamb, C., and Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.

Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R. G., and Last, R. L. (1993) *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* 5: 171-179.

Lichtenthaler, H. K. (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:4755.

Logemann, E., Parniske, M., and Hahlbrock, K. (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:5905 5909.

Lunau, K. (1992) A new interpretation of flower guide colouration: Absorption of ultraviolet light enhances colour saturation. *Plant Sys. Evol.* 183: 5155.

McConn, M., Creelman, R. A., Bell, E., Mullet, J. E., and Browse, J. (1997) Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5473-5477.

Niimberger, T, and Scheel, D. (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6:372-379.

Papadopoulou, K., Melton, R. E., Legget, M., Daniels, M. J., and Osbourn, A. E. (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12923-12928.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., and Ryan, C. A. (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.

Peumans, W. J., and Van Damme, E. J. M. (1995) Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 109: 347-352.

Poulton J. E. (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol.* 94: 401-105.

Renwick, J. A. A., Radke, C. D., Sachdev-Gupta, K., and Staedler, E. (1992) Leaf surface chemicals stimulating oviposition by *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on cabbage. *Chemoecology* 3: 33-38.

PARTE

III

Crescimento e desenvolvimento

Capítulo da Internet*

14 Expressão gênica e transdução de sinal

Conteúdo disponível em www.plantphys.net

Cada célula viva contém um conjunto de instruções para a construção do organismo, consistindo de genes organizados linearmente na forma de cromossomos. Esse conceito fundamental da biologia teve início com Mendel e seus estudos com ervilhas, em 1865, culminando com a descoberta da estrutura do DNA, por Watson e Crick, em 1953. Mas a história continuou... Um novo campo de biologia molecular surgiu com ênfase na estrutura, na replicação e na expressão de genes. Os genes codificam as proteínas e a elucidação do complexo mecanismo envolvido na transcrição e na tradução foi um dos primeiros triunfos dessa área da biologia molecular. Mais recentemente, os biólogos moleculares têm procurado entender como a expressão gênica é regulada, tendo sido descoberto que as "instruções" genéticas encontradas nos cromossomos são incompletas sem a ação de proteínas de regulação presentes no citoplasma que controlem essa expressão. Neste capítulo, serão revisados os conceitos básicos de expressão gênica em procariontes e em eucariontes.

Enquanto os biólogos moleculares estudavam as funções celulares a partir do gene, os biólogos que se ocupam do desenvolvimento rastreavam os sinais que regulam tanto o desenvolvimento interno quanto o externo, a partir da superfície celular. Eles descobriram que os sinais para o desenvolvimento, tais como luz ou hormônios, incluem receptores específicos e requerem uma amplificação na forma de "mensageiros secundários". Basicamente, tais mensageiros regulam as atividades dos processos cruciais, como, por exemplo, transporte de membrana ou expressão gênica, os quais levam às respostas fisiológicas ou de desenvolvimento. Assim, biólogos moleculares e do desenvolvimento abordam o mesmo problema a partir de direções opostas. A segunda parte deste capítulo fornece uma visão geral dos vários mecanismos de

TAMANHO, ORGANIZAÇÃO E COMPLEXIDADE DO GENOMA

A maioria dos genomas haplóides de plantas contém de 20.000 a 30.000 genes.

EXPRESSÃO GÊNICA EM PROCARIONTES

As proteínas que se ligam ao DNA regulam a transcrição em procariontes.

EXPRESSÃO GÊNICA EM EUCARIONTES

Os transcritos nucleares em células eucarióticas necessitam de processamento.

Vários mecanismos de regulação pós-transcricional têm sido identificados.

A transcrição em eucariontes é modulada por seqüências reguladoras de ação *cis*.

Os fatores de transcrição contêm motivos estruturais específicos.

As proteínas homeodomínio constituem uma classe especial de proteínas hélice-volta-hélice.

Os genes eucarióticos podem ser regulados coordenadamente.

A rota da ubiquitina regula a recliclagem de proteínas.

TRANSDUÇÃO DE SINAL EM PROCARIONTES

As bactérias empregam sistemas reguladores de dois componentes para perceber sinais extracelulares.

A osmolaridade é detectada por um sistema de dois componentes.

Os sistemas de dois componentes relacionados foram identificados em eucariontes.

(Continua)

*O texto em língua portuguesa está disponível em www.artmed.com.br, em Material de Apoio.

sinalização encontrados nas células. Os modelos apresentados são provenientes de sistemas animais e de microrganismos, nos quais esses mecanismos foram descobertos. Os mecanismos relacionados em plantas serão discutidos nos vários capítulos do texto destinados ao desenvolvimento, à luz e aos hormônios.

TRANSDUÇÃO DE SINAL EM EUCARIONTES

Duas classes de sinais definem duas classes de receptores.
A maioria dos receptores de esteróides age como fatores de transcrição.
Os receptores da superfície celular podem interagir com as proteínas G.
As proteínas G heterotriméricas alteram-se entre as formas ativa e inativa.
A ativação da adenilil ciclase aumenta o nível de AMP cíclico.
A ativação da fosfolipase C inicia a rota do IP_3.
IP_3 abre os canais de cálcio no RE e no tonoplasto.
Ribose-ADP cíclico funciona como mediador na liberação intracelular de cálcio, independentemente da sinalização de IP_3.
Algumas proteínas quinases são ativadas pelo complexo cálcio-calmodulina.
As plantas contêm proteínas quinases dependentes do cálcio.
O diacilglicerol ativa a proteína quinase C.
A fosfolipase A_2 gera outros agentes sinalizadores derivados de membrana.
No sistema da visão dos vertebrados, a proteína G heterotrimérica ativa a fosfodiesterase GMP cíclico.
O óxido nítrico estimula a síntese do GMPc.
Os receptores de superfície celular podem ter atividade catalítica.
A interação do ligante às tirosina quinases receptoras (RTK) induz a autofosforilação.
As proteínas intracelulares de sinalização que se ligam às RTKs são ativadas por fosforilação.
Ras recruta a Raf para a membrana plasmática.
A MAP quinase ativada ingressa no núcleo.
Os receptores de quinases vegetais são estruturalmente similares aos receptores de tirosina quinase encontrados em animais.

RESUMO

Capítulo

15 *Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão*

AS CÉLULAS VEGETAIS, DE MODO DIFERENTE DAS ANIMAIS, são delimitadas por uma parede relativamente delgada, mas mecanicamente forte. Essa parede consiste de uma mistura complexa de polissacarídeos e outros polímeros, secretados pela célula e reunidos em uma rede organizada por meio de ligações covalentes e não-covalentes. As células vegetais contêm, além disso, proteínas estruturais, enzimas, polímeros fenólicos e outros materiais que modificam as características físicas e químicas da parede.

As paredes celulares de procariontes, fungos, algas e plantas são distintas entre si quanto à composição química e à estrutura microscópica, ainda que todas tenham em comum duas funções primordiais: regulação do volume e determinação da forma da célula. Todavia, conforme será visto, as paredes celulares de plantas têm adquirido funções adicionais que não são aparentes nas de outros organismos. Em decorrência dessa diversidade de funções, a estrutura e a composição das paredes celulares vegetais são complexas e variáveis.

Além dessas funções biológicas, a parede celular vegetal é importante em atividades humanas ligadas à economia. Como um produto natural, a parede celular vegetal é usada comercialmente para a fabricação de papel, as manufaturas têxteis, as fibras (algodão, linho e cânhamo, entre outros), carvão vegetal, construção civil e distintos produtos madeireiros. Um outro uso importante de paredes celulares vegetais é sob forma de polissacarídeos extraídos, os quais são modificados para o fabrico de plásticos, filmes, tintas, adesivos, géis e espessadores em uma ampla variedade de produtos.

Como a reserva mais abundante de carbono orgânico na natureza, a parede celular vegetal também participa no processo do fluxo do carbono através dos ecossistemas. As substâncias orgânicas que constituem o húmus do solo e que melhoram a sua estrutura e a sua fertilidade são derivadas de paredes celulares. Por fim, como uma fonte importante de matéria-prima em nossa dieta, é um fator relevante na saúde e na nutrição humana.

Neste capítulo será feita uma descrição da estrutura geral e composição de paredes celulares, bem como dos mecanismos da síntese e secreção de materiais de parede celular. Após, verificar-se-á o papel da parede primária na expansão celular. Os mecanismos de crescimento apical serão confrontados com os de crescimento difuso, em particular quanto ao estabelecimento da polaridade da célula e o controle da sua taxa de expansão. Ao final, serão descritas as

alterações dinâmicas na parede da célula que freqüentemente acompanham a sua diferenciação, junto com o papel de fragmentos de parede celular como moléculas de sinalização.

A ESTRUTURA E A SÍNTESE DAS PAREDES CELULARES VEGETAIS

Sem parede celular, as plantas seriam organismos muito diferentes do que conhecemos. De fato, a parede celular é essencial para muitos processos no crescimento, no desenvolvimento, na manutenção e na reprodução da planta:

- As paredes celulares determinam a resistência mecânica de estruturas vegetais, permitindo-lhes a alcançar grandes alturas.
- As paredes promovem a junção da células, evitando que deslizem e se separem. Tal processo de impedimento do movimento celular contrasta marcadamente com a situação em células animais e determina a maneira pela qual as plantas se desenvolvem (ver Capítulo 16).
- Como um rígido revestimento envolvendo a célula, a parede celular atua como um "exoesqueleto" que controla a forma e possibilita o desenvolvimento de altas pressões de turgor.
- A morfogênese vegetal depende, em larga escala, do controle das propriedades da parede celular, pois o crescimento expansivo de células vegetais é limitado sobretudo pela capacidade de expansão da parede celular.
- A parede celular é necessária para as relações hídricas normais de plantas, pois determina a relação entre pressão de turgor e volume celular (ver Capítulo 3).
- O fluxo de massa de água no xilema exige uma parede mecanicamente rígida, que resista a colapso provocado por pressão negativa no xilema.
- A parede atua como uma barreira à difusão, limitando o tamanho de macromoléculas que podem alcançar a membrana plasmática a partir do exterior, além de ser a principal barreira estrutural à invasão de patógenos.

Muito do carbono assimilado na fotossíntese é transformado em polissacarídeos de parede. Durante fases específicas de desenvolvimento, esses polímeros podem ser hidrolisados em seus açúcares constituintes, passíveis de serem usados pela célula para formar novos polímeros. O fenômeno é mais notável em muitas sementes, nas quais os polissacarídeos do endosperma ou dos cotilédones funcionam sobretudo como reservas nutritivas. Ademais, os oligossacarídeos componentes da parede celular podem atuar como moléculas de sinalização importantes durante a diferenciação celular, bem como por ocasião do reconhecimento de patógenos e simbiontes.

A diversidade de funções da parede celular vegetal exige uma estrutura diversa e complexa. Esta seção iniciará com uma breve descrição da morfologia e arquitetura básica de paredes celulares. A seguir, serão discutidas a organização, a composição e a síntese de paredes celulares primárias e secundárias.

As paredes celulares possuem arquitetura variada

As seções coradas de tecidos vegetais revelam que a parede celular não é uniforme, mas varia muito em aparência e composição, conforme o tipo de célula (Figura 15.1). As paredes celulares do parênquima cortical são em geral delgadas e têm poucas características distintivas. Por outro lado, as paredes de algumas células especializadas, tais como as células da epiderme e do colênquima, as fibras do floema, os elementos traqueais e outras formas de esclerênquima têm paredes espessas e multicamadas. Freqüentemente, tais paredes apresentam uma estrutura complexa e são impregnadas com substâncias específicas, tais como lignina, cutina, suberina, ceras, sílica ou proteínas estruturais.

Os lados de uma parede que delimitam uma célula podem também variar em espessura, substâncias impregnadas, ornamentação, freqüência de pontoações e plasmodesmas. A parede externa da epiderme, por exemplo, é geralmente muito mais espessa que as demais paredes celulares; além disso, ela não tem plasmodesmas e é impregnada com cutina e ceras. Nas células-guarda, o lado da parede adjacente ao ostíolo é muito mais espesso que as paredes dos demais lados da célula. Tais variações na arquitetura da parede de uma única célula refletem a sua polaridade e funções diferenciadas, além de se originarem da secreção definida de componentes de parede para a superfície celular.

Apesar dessa diversidade morfológica, as paredes celulares comumente são classificadas em dois tipos principais: primárias e secundárias. As **paredes primárias,** formadas por células em cres-

Epiderme
Córtex
Fibras do floema
Floema
Câmbio
Xilema
Medula

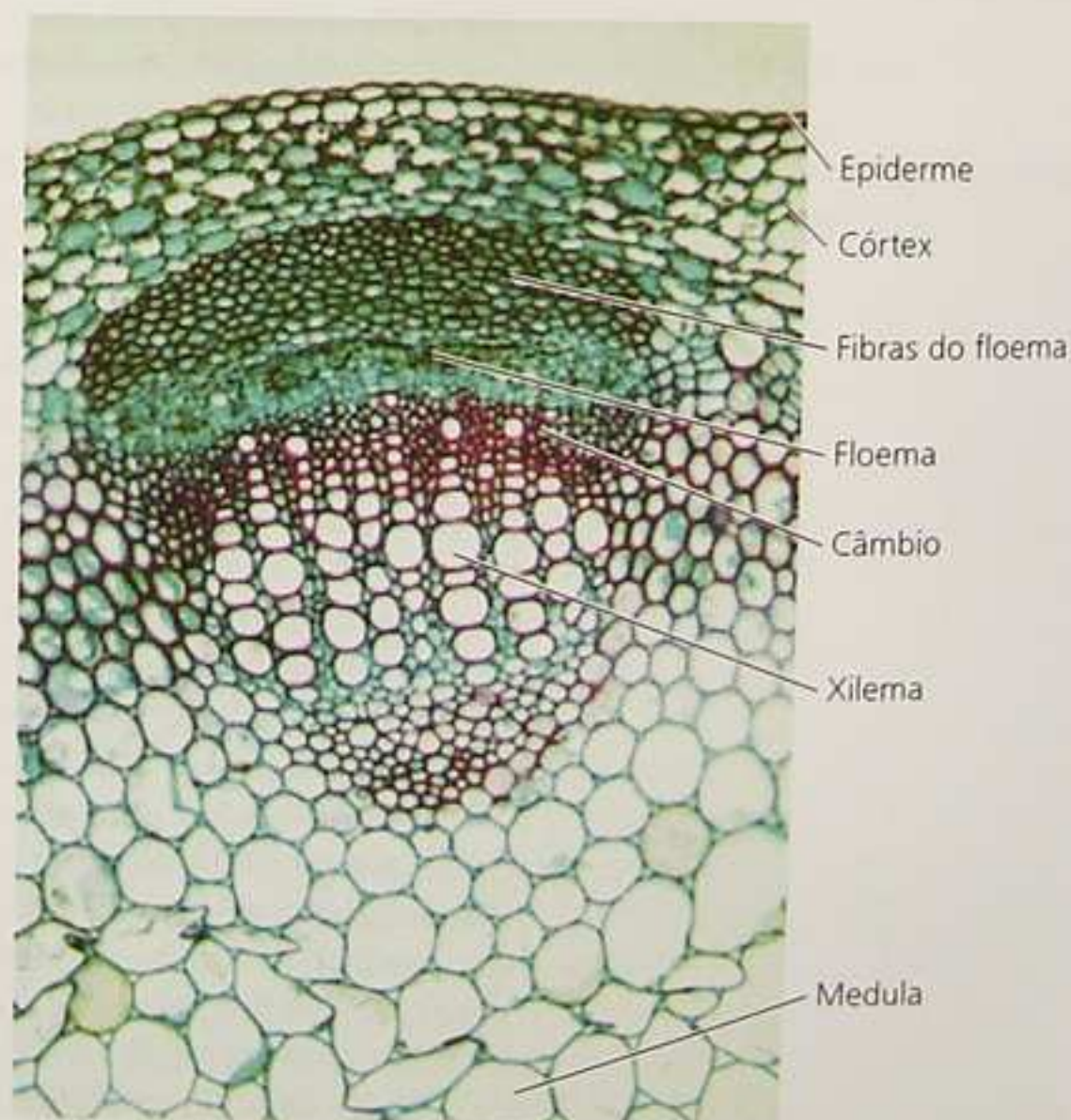



FIGURA 15.1 Seção transversal de um caule de trevo (*Trifolium*), mostrando células com morfologia de parede variada. Observe as paredes altamente espessadas das fibras do floema (fotografia © James Solliday/Biological Photo Service).

cimento, são, via de regra, consideradas não-especializadas e semelhantes, quanto à arquitetura molecular, em todos tipos celulares. Todavia, a ultra-estrutura de paredes primárias também mostra ampla variação. Algumas paredes primárias, como as de parênquima de bulbo da cebola, são muito delgadas (100 nm) e de arquitetura simples (Figura 15.2). Outras paredes primárias, tais como as encontradas no colênquima ou na epiderme (Figura 15.3), podem ser muito mais espessas e consistir de camadas múltiplas.

As **paredes secundárias,** por sua vez, formam-se após cessado o crescimento da célula. As paredes secundárias podem se tornar altamente especializadas em estrutura e composição, refletindo o estado diferenciado da célula. As células de xilema, tais como as encontradas na madeira, são notáveis por possuírem paredes secundárias altamente espessadas, reforçadas por lignina (ver Capítulo 13).

Uma camada delgada de material, a **lamela média,** pode, em geral, ser vista na junção das paredes de células vizinhas. A composição da lamela média difere do restante da parede, pois ela é rica em pectina e contém proteínas diferentes, quando comparada com a massa da parede. Sua origem pode ser acompanhada na placa celular formada durante a divisão da célula.

Como o Capítulo 1 mostrou, a parede celular via de regra é penetrada por canais estreitos revestidos de membrana, denominados **plasmodesmas,** que ligam células vizinhas. Os plasmodesmas funcionam na comunicação entre células, permitindo o transporte passivo de moléculas pequenas e o transporte ativo de proteínas e ácidos nucléicos entre citoplasmas de células adjacentes.

A parede primária é composta de microfibrilas de celulose inseridas em uma matriz de polissacarídeos

Nas paredes celulares primárias, as microfibrilas de celulose são implantadas em uma matriz altamente hidratada (Figura 15.4). Tal estrutura fornece resistência e flexibilidade. No caso de paredes celulares, a **matriz** consiste de dois grupos principais de polissacarídeos, em geral chamados de hemiceluloses e pectinas, mais uma pequena quantidade de proteína estrutural. A matriz de polissacarídeos consiste de uma variedade de polímeros, que podem variar de acordo com o tipo de célula e com a espécie vegetal (Tabela 15.1).

Esses polissacarídeos são denominados de acordo com os açúcares principais que contêm. Um *glucano*, por exemplo, é um polímero constituído de glicose, um *xilano* é feito de xilose, um *galactano* é constituído de galactose, e assim por diante. *Glicano* é o termo geral para um polímero formado de açúcares. Para polissacarídeos ramificados, a estrutura básica é geralmente indicada pela última parte do nome.

O *xiloglucano*, por exemplo, tem uma estrutura básica de glucano (uma cadeia linear de resíduos de glicose) com xilose ligada a ele nas cadeias laterais; o *glucuronoarabinoxilano* tem uma estrutura básica de xilano (constituída de subunidades de xilose) com ácido glucurônico e cadeias laterais de arabinose. Entretanto, um nome composto não indica necessariamente uma estrutura ramificada. *Glucomanano*, por exemplo, é a denominação do polímero que contém glicose e manose em sua estrutura básica.

(A) 200 nm

(B) 200 nm

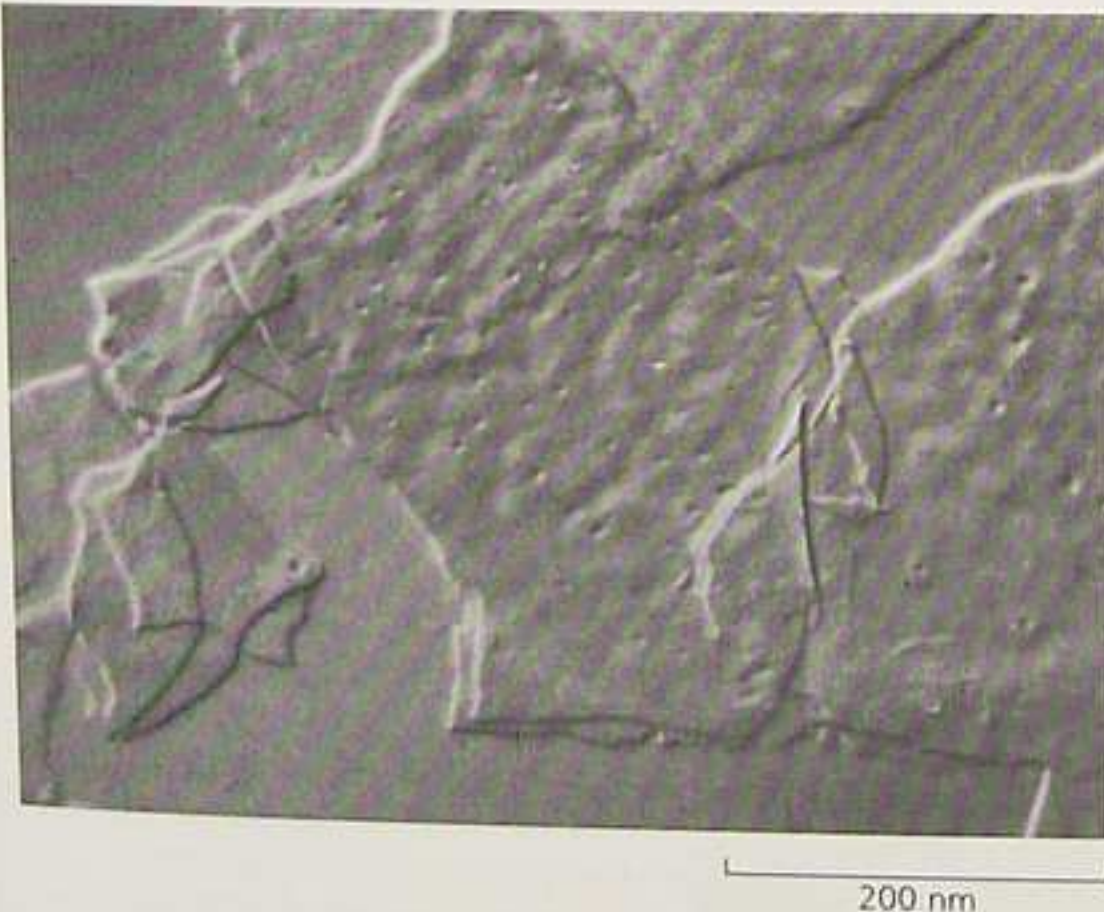
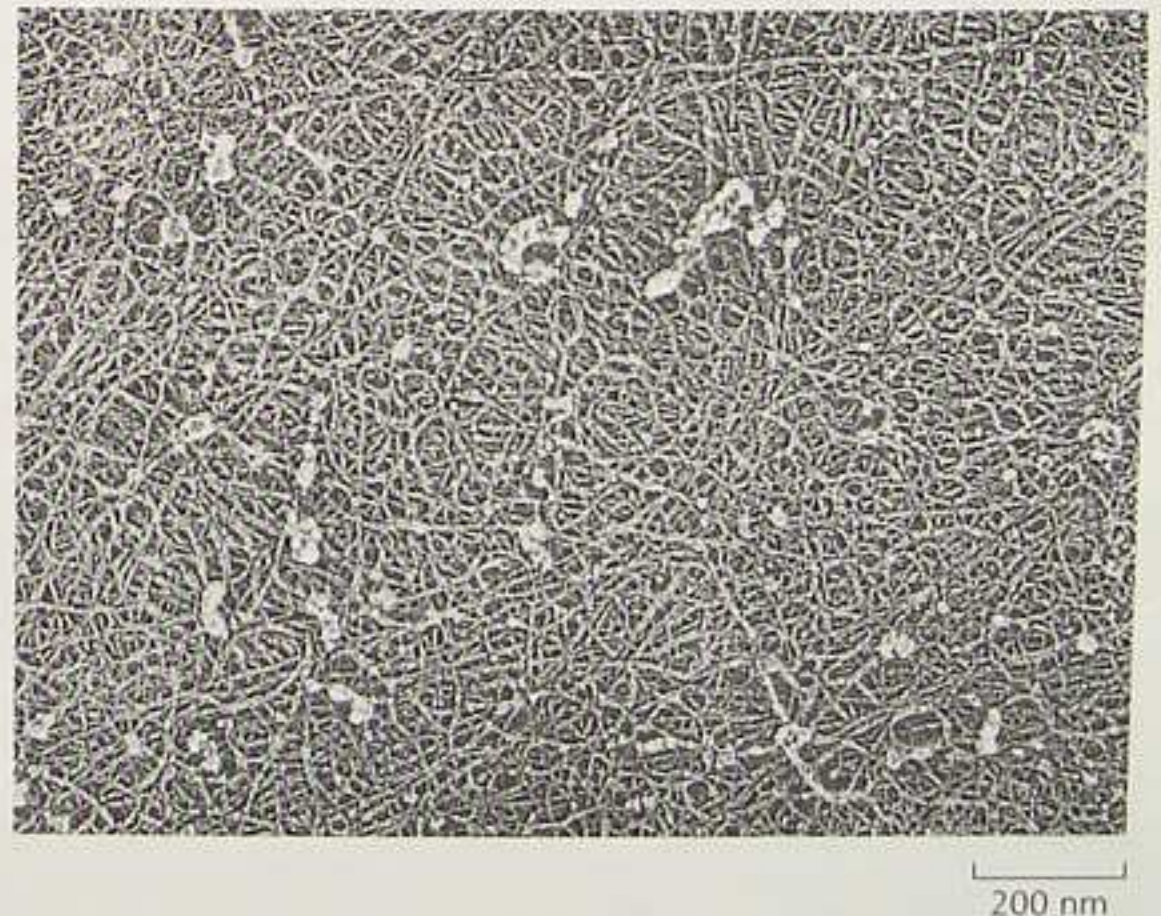



FIGURA 15.2 Paredes celulares primárias do parênquima da cebola. (A) Esta vista frontal de fragmentos de parede celular foi feita com o uso da óptica de Nomarski. Observe que a parede assemelha-se a uma lâmina muito fina com pequenas depressões superficiais; tais depressões podem ser campos de pontoação, locais onde estão concentradas conexões de plasmodesmas entre células. (B) Esta vista frontal de uma parede celular foi preparada por meio da técnica da réplica por sublimação com gelo (do inglês, *freeze-etch*). Ela mostra a natureza fibrilar da parede celular (McCann e cols., 1990, cedidas por M. McCann).

FIGURA 15.3 Electromicrografia da parede celular externa da epiderme, na região de crescimento de um hipocótilo de feijoeiro. São visíveis camadas múltiplas dentro da parede. As camadas internas são mais espessas e mais definidas do que as camadas externas, porque estas são as regiões mais velhas da parede e foram estendidas e adelgaçadas pela expansão celular (Roland e cols., 1982).

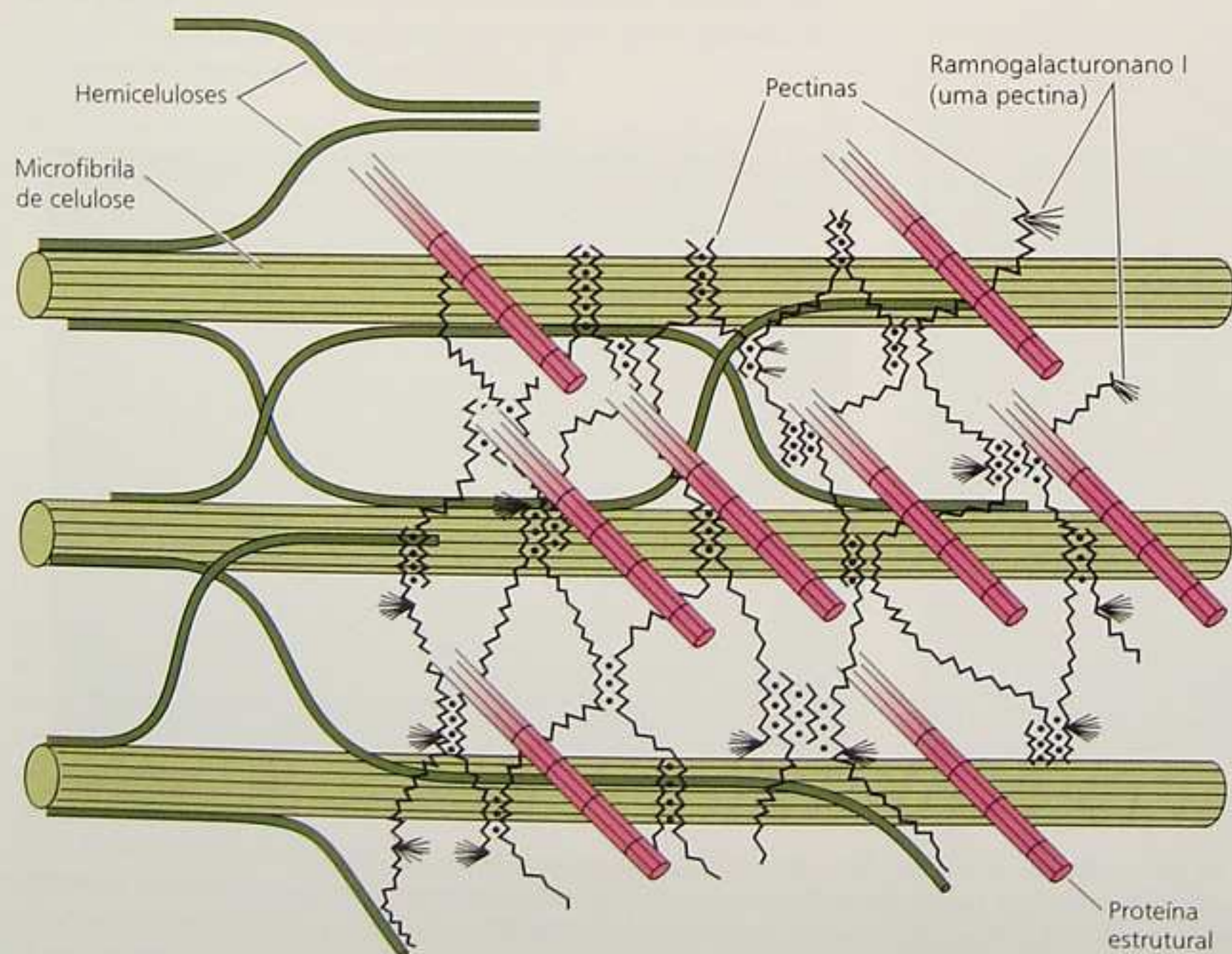
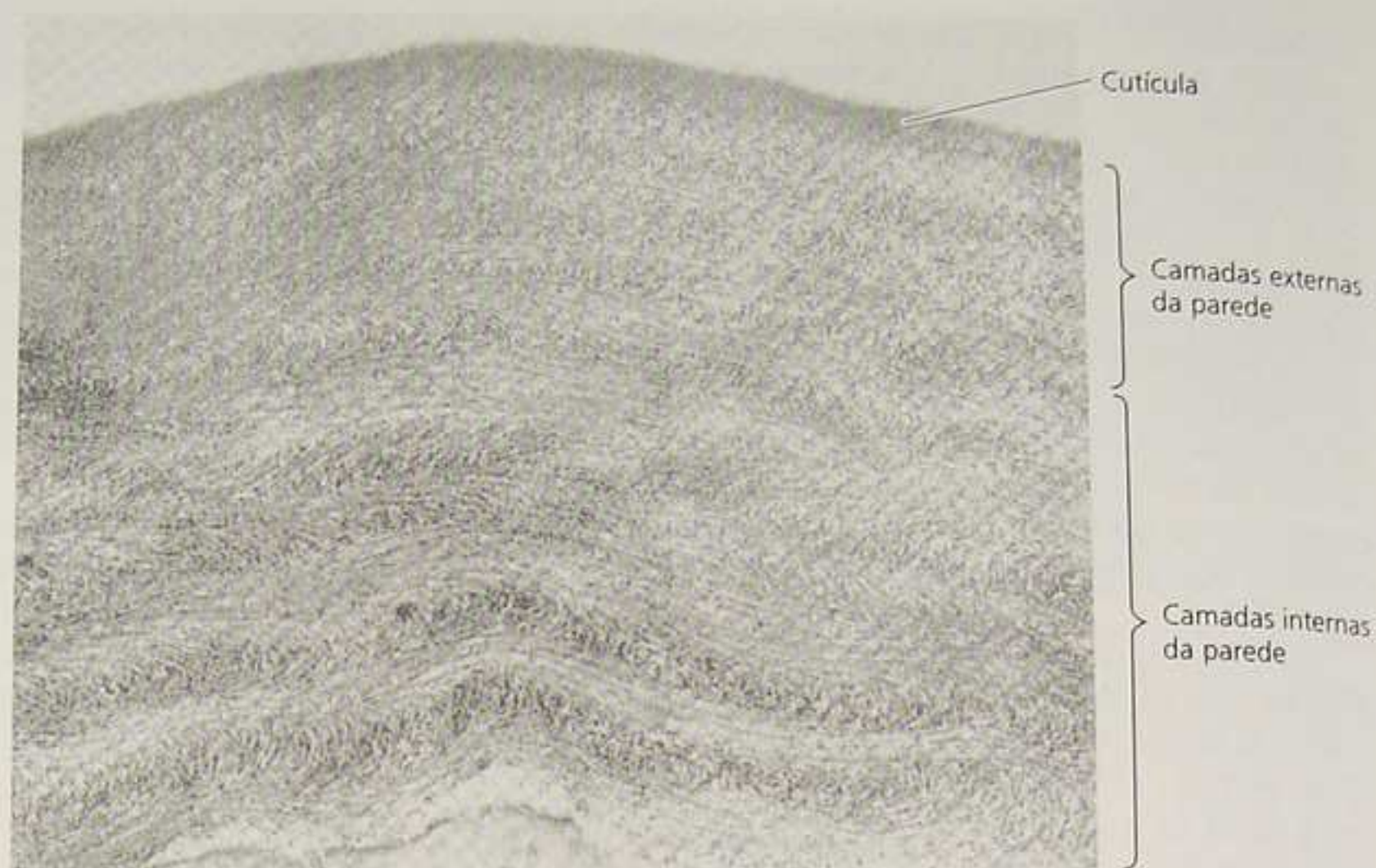



FIGURA 15.4 Diagrama esquemático dos principais componentes estruturais da parede celular primária e seu provável arranjo. As microfibrilas de celulose são revestidas com hemiceluloses (como o xiloglucano), que podem também ligar as microfibrilas entre si. As pectinas formam um gel de matriz de ligação, talvez interagindo com proteínas estruturais (Brett e Waldron, 1996).

TABELA 15.1
Componentes estruturais de paredes celulares vegetais

Classe	Exemplos
Celulose	Microfibrilas de β-(1→4) D-glucano
Polissacarídeos de matriz	
Pectinas	Homogalacturonano Ramnogalacturonano Arabinano Galactano
Hemiceluloses	Xiloglucano Xilano Glucomanano Arabinoxilano Calose β-(1→3)D-glucano β-(1→3,1→4)D-glucano [apenas gramíneas]
Lignina	(ver Capítulo 13)
Proteínas estruturais	(ver Tabela 15.2)

As **microfibrilas de celulose** são estruturas relativamente rígidas que contribuem para a resistência e a predisposição estrutural da parede celular. Os glucanos individuais que constituem a microfibrila estão firmemente alinhados e ligados entre si, formando uma fita altamente ordenada (**cristalina**), que exclui água e é relativamente inacessível ao ataque enzimático. Como resultado, a celulose é muito forte, muito estável e resiste à degradação.

As **hemiceluloses** são polissacarídeos flexíveis que caracteristicamente ligam-se à superfície da celulose. Elas podem formar correntes que reúnem microfibrilas de celulose em uma rede coesa (ver Figura 15.4) ou podem funcionar como um revestimento deslizante para impedir o contato direto entre microfibrilas. Uma outra denominação para tais moléculas é *glucanos de ligação cruzada*, mas neste capítulo será usado o termo mais tradicional: *hemiceluloses*. Conforme será descrito posteriormente, o termo *hemicelulose* abrange vários tipos diferentes de polissacarídeos.

As **pectinas** formam uma fase gel hidratada na qual está implantada a rede celulose-hemicelulose. Elas atuam como preenchimento hidrofílico, impedindo a agregação e o colapso da rede de celulose. Elas estabelecem também a porosidade da parede celular para as macromoléculas. Como as hemiceluloses, as pectinas incluem vários tipos diferentes de polissacarídeos.

Não se conhece exatamente o papel das **proteínas estruturais** de parede. Por outro lado, sabe-se que elas podem adicionar resistência mecânica à parede e tomar parte na construção propriamente dita de outros componentes de parede.

A parede primária é composta de aproximadamente 25% de celulose, 25% de hemiceluloses e 35% de pectinas, com talvez 1 a 8% de proteína estrutural, sobre uma base de matéria seca. No entanto, podem ser encontrados desvios grandes desses valores. As paredes de coleóptilos de gramíneas, por exemplo, consistem de 60 a 70% de hemiceluloses, 20 a 25% de celulose e apenas cerca de 10% de pectinas. As paredes do endosperma de cereais são constituídas principalmente (cerca de 85%) de hemiceluloses. As paredes secundárias apresentam tipicamente conteúdos celulósicos muito mais altos.

Neste capítulo, será apresentado um modelo básico da parede primária, mas esteja ciente de que as paredes celulares possuem uma diversidade muito maior do que este modelo sugere. A composição dos polissacarídeos da matriz e das proteínas estruturais em paredes varia muito entre espécies diferentes e tipos celulares (Carpita e McCann, 2000). Digno de nota é que, em gramíneas e espécies relacionadas, os polissacarídeos mais importantes da matriz diferem daqueles que formam a matriz da maioria das outras plantas é terrestre (Carpita, 1996).

A parede primária contém também muita água, localizada na matriz, a qual tem, tavez, 75 a 80% de água. O estado de hidratação da matriz é um determinante importante das propriedades físicas da parede; por exemplo, a remoção da água torna a parede rígida e menos extensível. Este efeito de endurecimento causado pela desidratação pode exercer um papel na inibição do crescimento por déficits hídricos. Nas seções a seguir, examinar-se-á mais detalhadamente a estrutura de cada um dos polímeros importantes da parede celular.

As microfibrilas de celulose são sintetizadas na membrana plasmática

A celulose é uma microfibrila firmemente empacotada de cadeias lineares de D-glicose com ligações β-(1→4) (Figura 15.5 e Tópico 15.1 na Internet). Devido à configuração espacial alternante das ligações glicosídicas que unem resíduos de glicose adjacentes, a unidade de repetição da celulose é considerada a celobiose, um dissacarídeo de D-glicose com ligações β-(1→4).

As microfibrilas de celulose são de comprimento indeterminado e variam consideravelmente em largura e grau de ordem, dependendo da fonte. As microfibrilas de celulose em plantas terrestres, por exemplo, ao microscópio eletrônico, parecem ter 5 a 12 nm de largura, enquanto aquelas formadas por algas podem ter acima de 30 nm de largura e ser mais cristalinas. Essa variedade em largura corresponde a uma variação no número de cadeias paralelas que constituem a secção transversal de uma microfibrila — estima-se que existem aproximadamente 20 a 40 cadeias individuais nas microfibrilas mais delgadas.

A estrutura molecular exata das microfibrilas de celulose ainda é desconhecida. Os modelos atuais da organização microfibrilar sugerem que ela tem uma subestrutura constituída de domínios altamente cristalinos unidos por regiões "amorfas" menos organizadas (Figura 15.6). Dentro dos domínios cristalinos, os glucanos adjacentes estão altamente ordenados e unidos entre si por ligações não-covalentes, tais como ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

As cadeias individuais de glucano da celulose são compostas de 2.000 a mais do que 25.000 resíduos de glicose (Brown e cols., 1996). Tais cadeias são suficientemente longas (cerca de 1 a 5 μm de comprimento) para se estender ao longo de múltiplas regiões cristalinas e amorfas dentro de um microfibrila. Quando a celulose é degradada — por celulases fúngicas, por exemplo —, primeiramente são degradadas as regiões amorfas, liberando pequenas cristalitas, consideradas como correspondentes aos domínios cristalinos da microfibrila.

A ligação não-covalente extensiva entre glucanos adjacentes dentro de uma microfibrila de celulose oferece a essa estrutura propriedades extraordinárias. A celulose tem uma alta resistência elástica, equivalente à do aço. A celulose é também insolúvel, quimicamente estável e relativamente imune ao ata-

(A) **Hexoses**

β-D-Galactose

β-D-Glicose

β-D-Manose

(B) **Pentoses**

β-D-Xilose

β-L-Arabinose

α-D-Apiose

(C) **Ácidos urônicos**

α-D-Ácido galacturônico (GalA)

α-D-Ácido glucurônico (GlcA)

(D) **Açúcares deóxi**

α-L-Ramnose (Rha)

α-L-Fucose (Fuc)

(E) **Celobiose**

Glicosil

Glicose

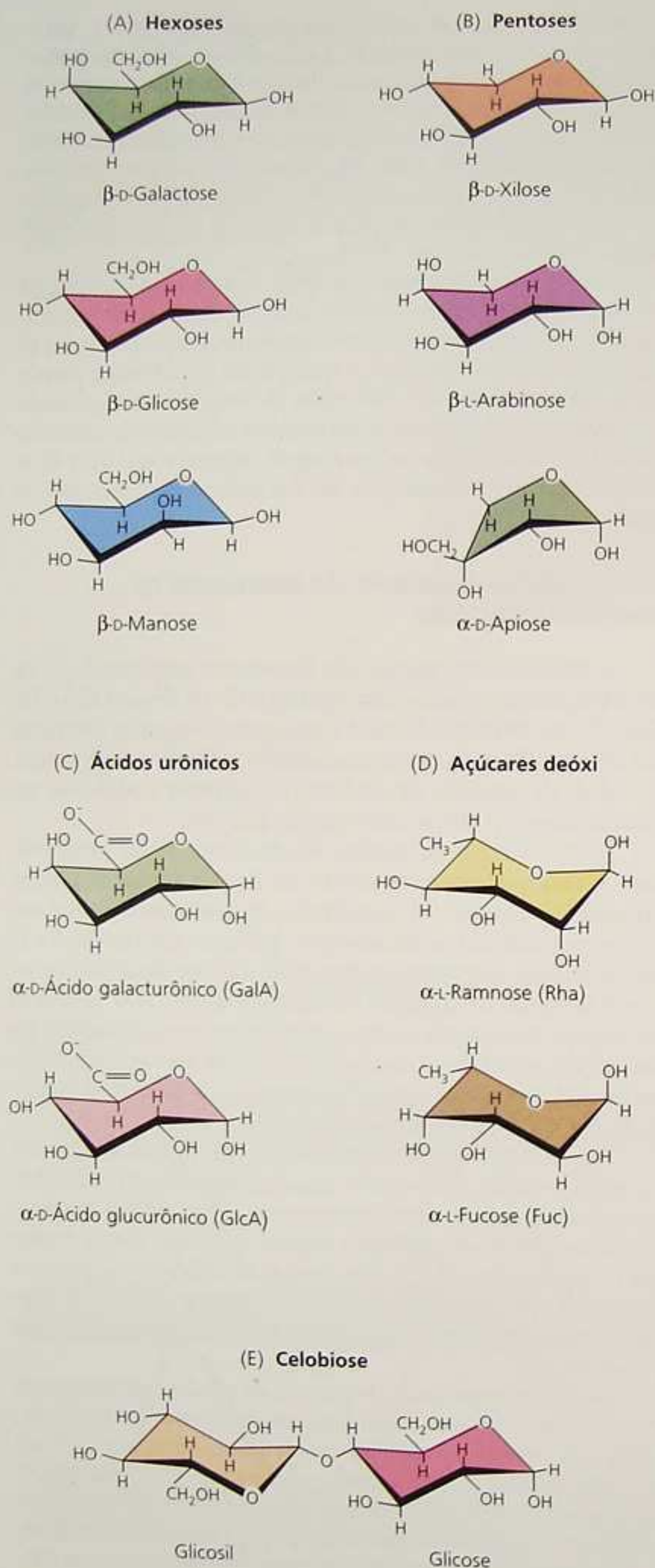



FIGURA 15.5 Estruturas da conformação de açúcares comumente encontrados em paredes celulares. (A) Hexoses (açúcares de seis carbonos). (B) Pentoses (açúcares de cinco carbonos). (C) Ácidos urônicos (açúcares ácidos). (D) Açúcares deóxi. (E) Celobiose (mostrando a ligação β-(1→4)D entre dois resíduos de glicose em orientação invertida).

que químico e enzimático. Tais propriedades fazem da celulose um excelente material estrutural para formar uma parede celular forte.

As evidências obtidas através da microscopia eletrônica indicam que as microfibrilas de celulose são sintetizadas por complexos protéicos grandes e ordenados denominados **rosetas de partículas** ou **complexos terminais**, que estão implantadas na membrana plasmática (Figura 15.7) (Kimura e cols., 1999). Essas estruturas contêm muitas unidades de **celulose sintase**, a enzima que sintetiza os β-(1→4)D-glucanos individuais constituintes da microfibrila (ver **Tópico 15.2 na Internet**).

A celulose sintase, localizada no lado citoplasmático da membrana plasmática, transfere um resíduo de glicose de um doador de açúcar de nucleotídeo para a cadeia de glucano em crescimento. Os esterol-glicosídeos (esteróis ligados a uma cadeia de dois ou três resíduos de glicose) servem como iniciadores ou aceptores iniciais, para começar o crescimento de uma cadeia de glucano (Peng e cols., 2002). O esterol é retirado do glucano por uma endoglucanase e a cadeia de glucano em crescimento é, então, deslocada pela membrana para o exterior da célula, onde, junto com outras cadeias de glucanos, cristaliza em uma microfibrila e interage com xiloglucanos e outros polissacarídeos da matriz.

O doador de açúcar de nucleotídeo é provavelmente a uridina difosfato D-glicose (UDP-glicose). Evidências recentes sugerem que a glicose usada para a síntese de celulose pode ser obtida da sacarose (um dissacarídeo composto frutose e glicose) (Amor e cols., 1995; Salnikov e cols., 2001). Segundo esta hipótese, a enzima **sacarose sintase** atua como um canal metabólico para transferência da glicose tomada da sacarose, via UDP-glicose, para a cadeia de celulose em crescimento (Figura 15.8).

Após muitos anos de pesquisa, os genes para celulose sintase em plantas superiores foram isolados (Pear e cols., 1996; Arioli e cols., 1998; Holland e cols., 2000; Richmond e Somerville, 2000). Em *Arabidopsis*, as celulose sintases são parte de uma grande família de proteínas, cuja função pode ser sintetizar as estruturas básicas de muitos polissacarídeos de parede celular.

A formação de celulose envolve não apenas a síntese de glucano, mas também a cristalização de cadeias múltiplas de glucano dentro da microfibrila. Pouco é conhecido sobre o controle desse processo, exceto que a direção do depósito da microfibrila pode ser orientada por microtúbulos adjacentes à membrana.

Quando a microfibrila de celulose é sintetizada, ela fica depositada em um meio (a parede) que contém uma alta concentração de outros polissacarídeos, com capacidade de interação e, talvez, de modificar a microfibrila em crescimento. Os estudos sobre ligação *in vitro* têm mostrado que hemiceluloses, tais como xiloglucano e xilano, podem ligar-se à superfície da celulose. Algumas hemiceluloses também podem tornar-se fisicamente aprisionadas dentro da microfibrila durante a sua formação; assim, há uma redução da cristalinidade e da ordem da microfibrila (Hayashi, 1989).

Os polímeros da matriz são sintetizados no complexo de Golgi e secretados em vesículas

A matriz é uma fase altamente hidratada na qual estão implantadas as microfibrilas de celulose. Os principais polissacarídeos da matriz são sintetizados por enzimas ligadas à membrana no complexo de Golgi e são liberados para parede celular via exocitose de vesículas minúsculas (Figura 15.9 e **Tópico 15.3 na Inter-**

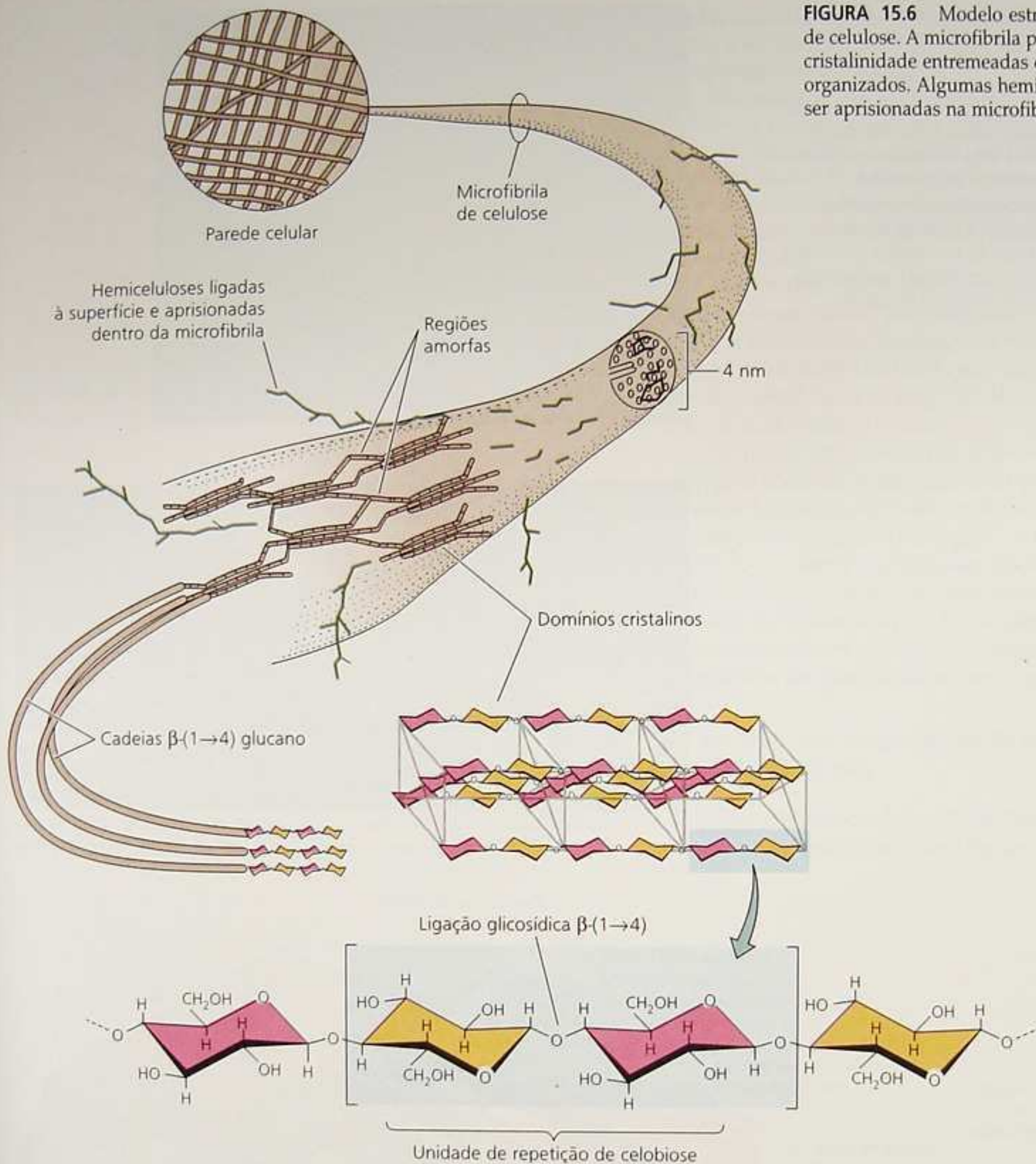



FIGURA 15.6 Modelo estrutural de uma microfibrila de celulose. A microfibrila possui regiões de alta cristalinidade entremeadas com glucanos menos organizados. Algumas hemiceluloses podem também ser aprisionadas na microfibrila e ligadas à superfície.

net). As enzimas responsáveis pela síntese são *açúcar-nucleotídeo polissacarídeo glicosiltransferases*. Tais enzimas transferem monossacarídeos de açúcares de nucleotídeos para a extremidade em crescimento da cadeia de polissacarídeos

Ao contrário da celulose, que forma uma microfibrila cristalina, os polissacarídeos da matriz, muito menos ordenados, são freqüentemente descritos como amorfos. Esse caráter não-cristalino é uma conseqüência da estrutura de tais polissacarídeos — sua conformação ramificada e não-linear. Todavia, estudos por espectroscopia apontam para uma ordem parcial na orientação de hemiceluloses e pectinas na parede celular, provavelmente resultante de uma tendência física que estes polímeros têm de se tornarem alinhados ao eixo longitudinal da celulose (Séné e cols., 1994; Wilson e cols., 2000).

As hemiceluloses são polissacarídeos de matriz que se ligam à celulose

As hemicelulioses constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos (Figura 15.10) que se ligam com firmeza à parede. Tipicamente, são solubilizados de paredes despectinadas, por meio de um álcali forte (1-4 *M* NaOH). Diversos tipos de hemiceluloses

FIGURA 15.7 Síntese de celulose pela célula. (A) Electromicrografia mostrando microfibrilas de celulose recém-sintetizadas no exterior imediato à membrana plasmática. (B) Réplicas impressas por criofratura, mostrando reações com anticorpos contra celulose sintase. Um campo de rosetas impressas (setas), com sete rosetas nitidamente identificadas e uma não. O detalhe apresenta uma visão ampliada de duas rosetas selecionadas (complexos terminais), identificadas com *imunogold*. (C) Diagrama esquemático, mostrando a celulose sendo sintetizada pelo complexo sintase de membrana ("roseta") e sua presumida orientação por microtúbulos subjacentes no citoplasma (A e C de Gunning e Steer, 1996; B de Kimura e cols., 1999).

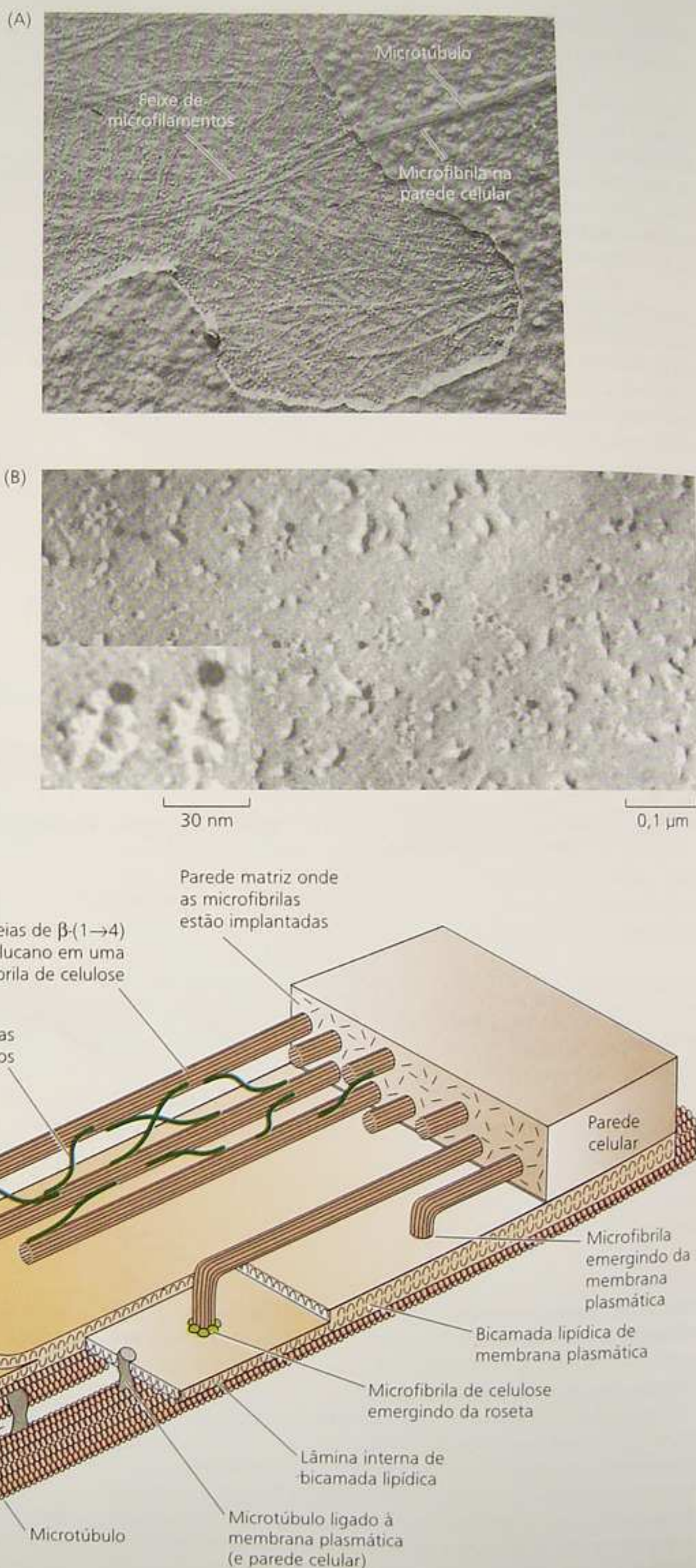
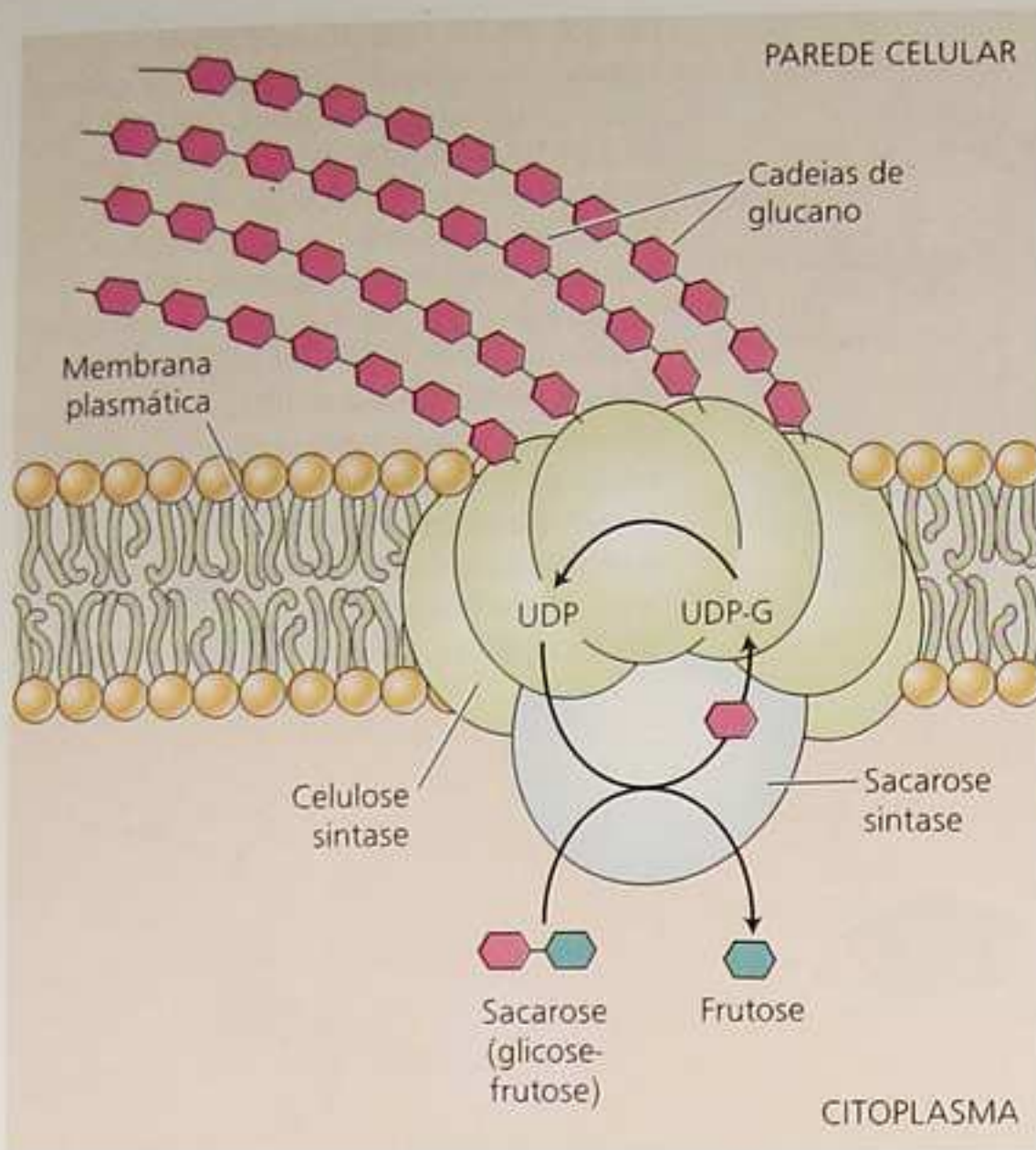



FIGURA 15.8 Modelo de síntese de celulose por um complexo com multissubunidades contendo celulose sintase. Os resíduos de glicose são doados às cadeias de glucano em crescimento pela UDP-glicose (UDP-G). A sacarose sintase pode atuar como um canal metabólico para transferir glicose tomada da sacarose para a UDP-glicose ou a UDP-glicose pode ser obtida diretamente do citoplasma (Delmer e Amor, 1995).

são encontrados em paredes celulares; as paredes de tecidos diferentes e de espécies diferentes, por sua vez, variam quanto à sua composição em hemiceluloses.

Na parede primária de dicotiledôneas (o melhor exemplo estudado), a hemicelulose mais abundante é o **xiloglucano** (ver Figura 15.10A). Como a celulose, esse polissacarídeo possui uma estrutura básica de resíduos de D-glicose com ligações β-(1→4). Contudo, diferentemente da celulose, o xiloglucano tem cadeias laterais curtas que contêm xilose, galactose e, muitas vezes, uma fucose terminal.

Por interferir no alinhamento entre as estruturas básicas de glucano, essas cadeias laterais impedem a reunião de xiloglucano em uma microfibrila cristalina. Visto que os xiloglucanos são mais longos (cerca de 50 a 500 nm) que o espaçamento entre microfibrilas de celulose (20 a 40 nm), eles têm potencial para ligar várias microfibrilas umas às outras.

Variando com o estado de desenvolvimento e com a espécie vegetal, a fração de hemiceluloses da parede pode conter também grandes quantidades de outros polissacarídeos importantes — **glucuronoarabinoxilanos** (ver Figura 15.10B) e **glucomananos**, por exemplo. As paredes secundárias tipicamente contêm menos xiloglucano e mais xilanos e glucomananos, que também se ligam fortemente à celulose. As paredes celulares de gramíneas possuem apenas quantidades pequenas de xiloglucano e pectina, as quais são substituídas por glucuronoarabinoxilano e β-(1→3,1→4)D-glucano.

As pectinas são componentes da matriz formadores de géis

Como as hemiceluloses, as pectinas constituem um grupo heterogêneo de polissacarídeos (Figura 15.11), caracteristicamente

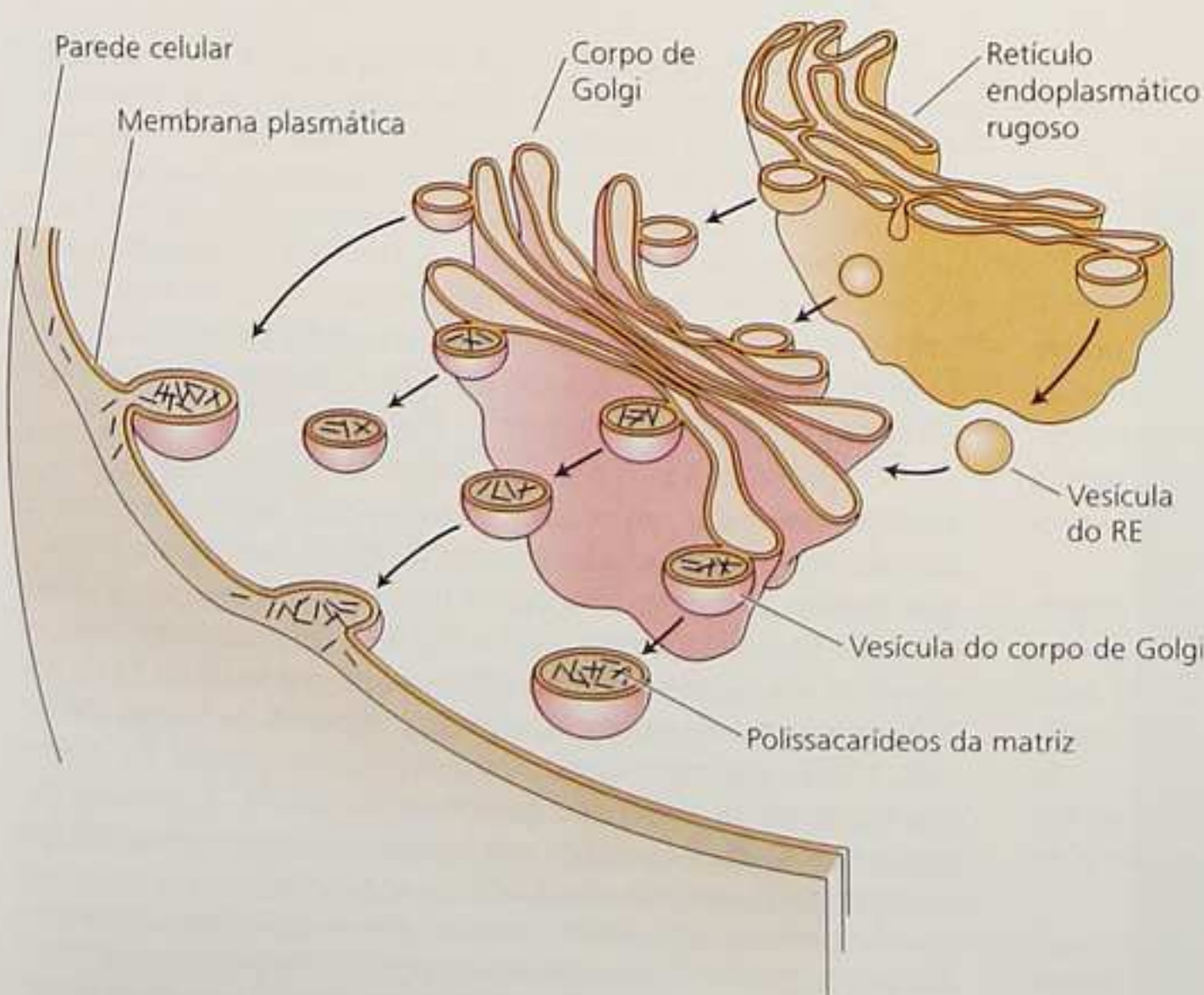



FIGURA 15.9 Esquema da síntese e liberação de polissacarídeos da matriz para a parede celular. Os polissacarídeos são sintetizados por enzimas no complexo de Golgi e, após, secretados para a parede, pela fusão de vesículas de membrana à membrana plasmática.

(A) **Xiloglucano**

α-D-Xyl-(1→6) α-D-Xyl-(1→6) α-D-Xyl-(1→6)

→ 4)β-D-Glc-(1→4)β-D-Glc-(1→4)β-D-Glc-(1→4)β-D-Glc-(1→4)β-D-Glc-(1→4)β-D-Glc

α-D-Xyl-(1→6)

(B) **Glucuronoarabinoxilano**

α-D-GlcA-(1→2) α-L-Ara-(1→2)

→ 4)β-D-Xyl-(1→4)β-D-Xyl-(1→4)β-D-Xyl-(1→4)β-D-Xyl-(1→4)β-D-Xyl-(1→4)β-D-Xyl

α-L-Ara-(1→2) α-L-Ara-(1→2)

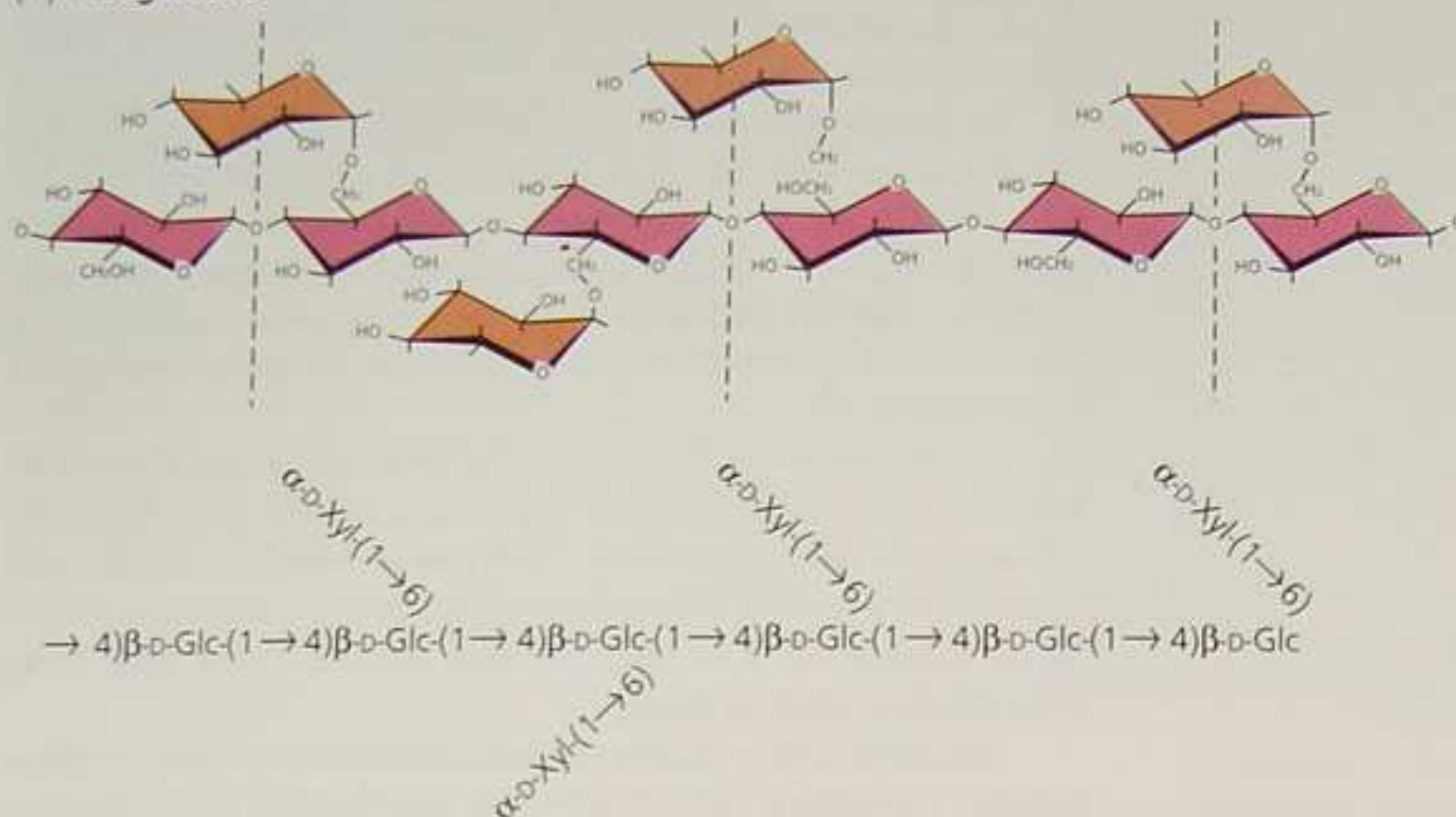
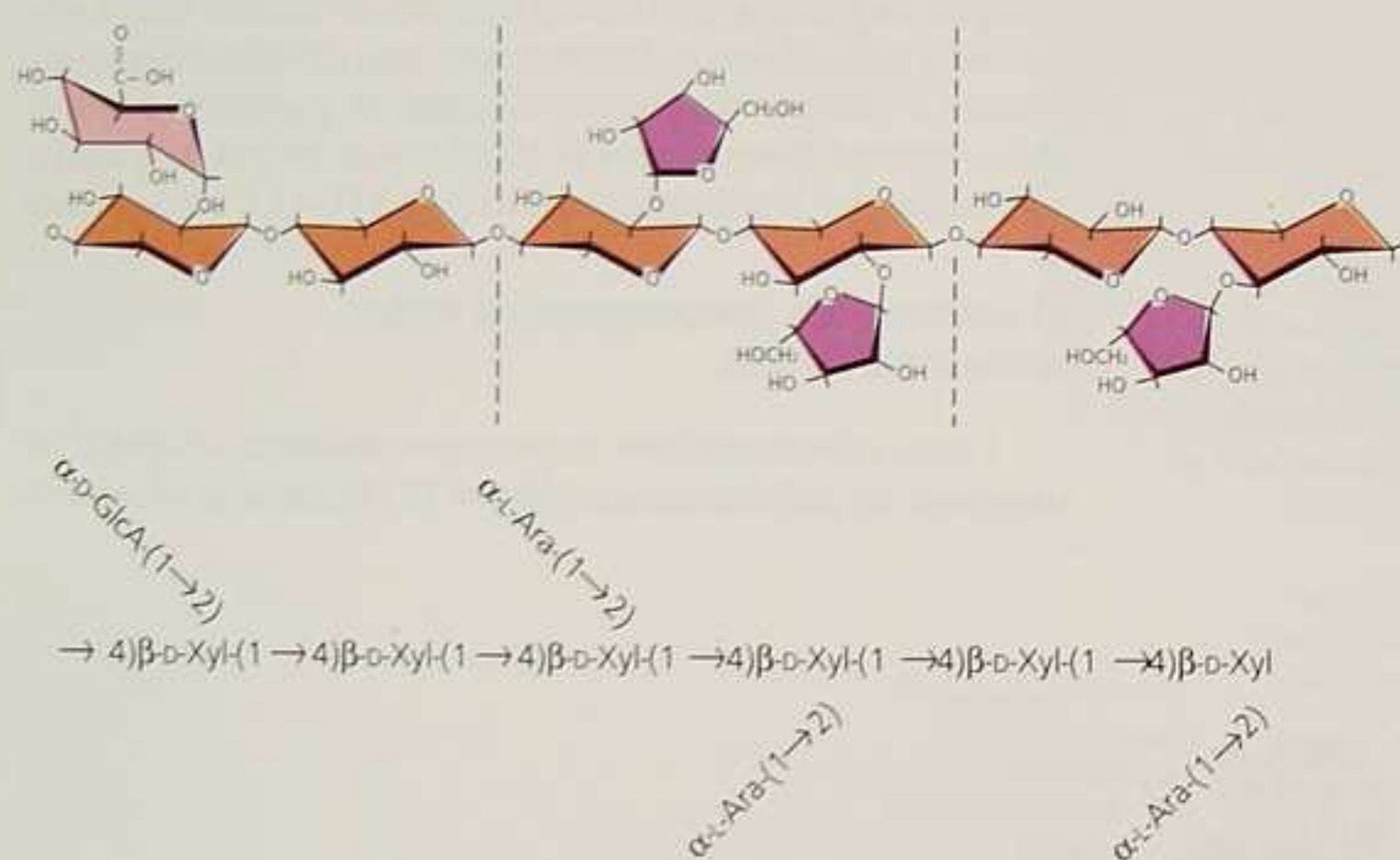



FIGURA 15.10 Estruturas parciais de hemiceluloses comuns (para detalhes sobre a nomenclatura de carboidratos, ver **Tópico 15.1 na Internet**). (A) O xiloglucano tem uma estrutura básica de D-glicoses (Glc) unidas por ligações β-(1→4), com ramos contendo D-xilose (Xyl) apresentando ligações β-(1→6). Em alguns casos, galactose (Gal) e fucose (Fuc) são adicionadas a tais cadeias laterais de xilose. (B) Os glucuronoarabinoxilanos têm uma estrutura básica de D-xilose (Xyl) com ligações β-(1→4). Eles também podem ter cadeias laterais contendo arabinose (Ara), ácido 4-O-metil-glucurônico (4-O-Me-α-D-GlcA) ou outros açúcares (Carpita e McCann, 2000).

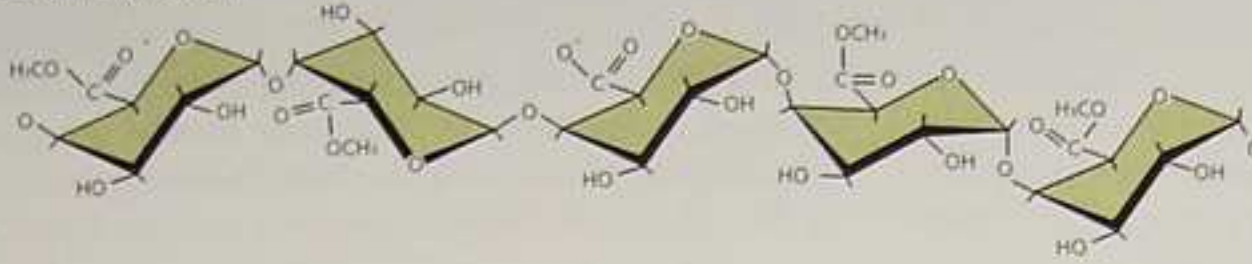
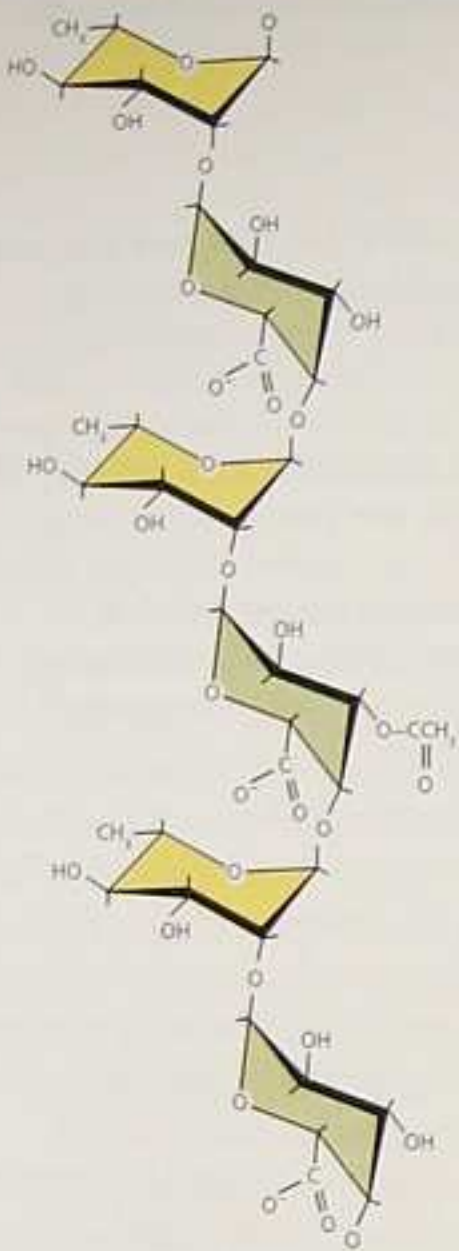
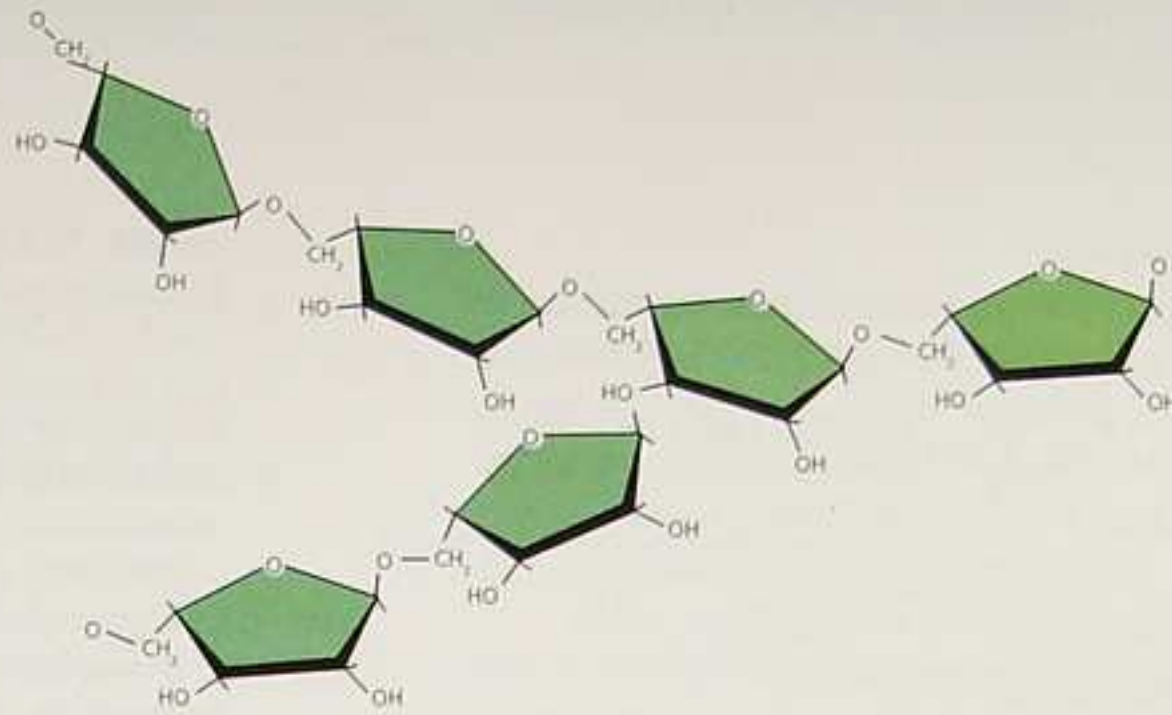
contendo açúcares ácidos, como ácido galacturônico, e açúcares neutros, tais como ramnose, galactose e arabinose. As pectinas são os mais solúveis dos polissacarídeos da parede, podendo ser extraídas com água quente ou com queladores de cálcio. Na parede, as pectinas também são moléculas muito grandes e complexas, compostas de tipos diferentes de polissacarídeos pécticos.

Alguns polissacarídeos pécticos possuem uma estrutura primária relativamente simples, tal como o *homogalacturonano* (ver Figura 15.11A). Este polissacarídeo, também chamado de *ácido poligalacturônico*, é um polímero de resíduos do ácido D-glucurônico com ligações α-(1→4). A Figura 15.12 mostra uma secção de células parenquimáticas do caule de tabaco marcada por tripla fluorescência, evidenciando a distribuição da celulose e do homogalacturonano péctico.

Uma das pectinas mais abundantes é o polissacarídeo complexo *ramnogalacturonano I (RG I)*, que tem uma estrutura básica longa e uma variedade de cadeias laterais (ver Figura 15.11B). Essa molécula é muito grande e acredita-se que contenha regiões altamente ramificadas ("pilosas", i. é, com cadeias laterais de arabinano e galactano) intercaladas com regiões não-ramificadas ("lisas") de homogalacturonano (Figura 15.13A).

Os polissacarídeos pécticos podem ser muito complexos. Um exemplo notável é um polissacarídeo péctico altamente ramificado denominado *ramnogalacturonano II (RG II)* (ver Figura 15.13C), que contém ao menos 10 açúcares diferentes em um padrão complexo de ligações. Embora RG I e RG II sejam nomes similares, *as estruturas dos mesmos são muito diferentes*. As unidades de RG II podem apresentar ligações cruzadas por diésteres de borato (Ishi e cols., 1999) e são importantes para a estrutura da parede. Por exemplo, mutantes de *Arabidopsis* que sintetizam um RG II alterado, incapaz de ter ligação cruzada por borato, mostram anormalidades substanciais de crescimento (O'Neil e cols., 2001).

As pectinas tipicamente formam géis — redes frouxas formadas por polímeros altamente hidratados. São as pectinas que formam as geléias de frutos. Nos géis pécticos, os grupos carboxila (COO^-) carregados de cadeias de pectina vizinhas são ligados via

(A) **Homogalacturonano (HGA)**

(B) **Ramnogalacturonano I (RG I)**

(C) **5-Arabinano**

(D) **Arabinogalactano do tipo I**

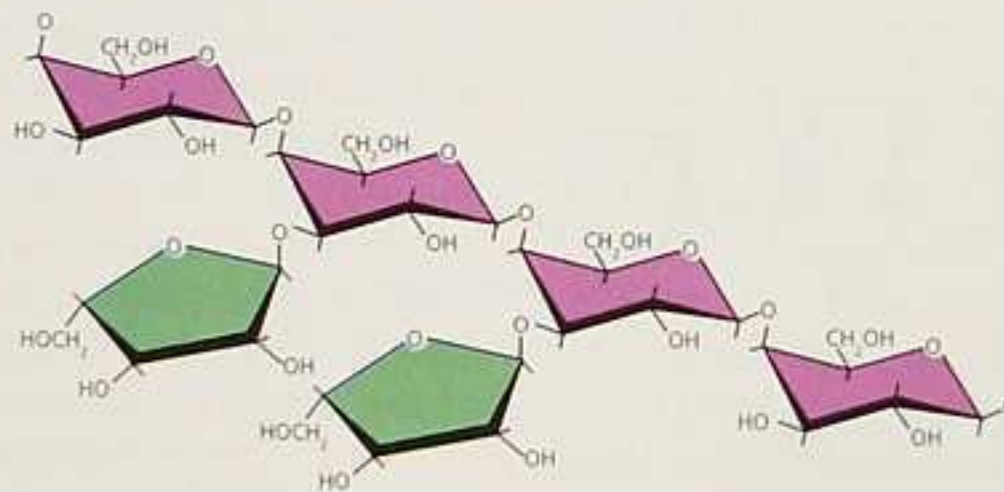



FIGURA 15.11 Estruturas parciais das pectinas mais comuns. (A) Homogalacturonano, também conhecido como ácido poligalacturônico ou ácido péctico, é constituído de ácido D-galacturônico (GalA) com ligações α-(1→4), com resíduos ocasionais de ramnosil que provocam uma torção na cadeia. Os resíduos de carboxila são freqüentemente metil esterificados. (B) O ramnogalacturonano I (RG I) é uma pectina muito grande e heterogênea, com uma estrutura básica onde se alternam ácido α-(1→4)D-galacturônico (GalA) e α-(1→2)D-ramnose (Rha). As cadeias laterais estão ligadas à ramnose e são compostas principalmente de arabinanos (C), galactanos e arabinogalactanos (D). Tais cadeias laterais podem ser curtas ou bastante longas. Os resíduos de ácido galacturônico são freqüentemente metil esterificados (Carpita e McCann, 2000).

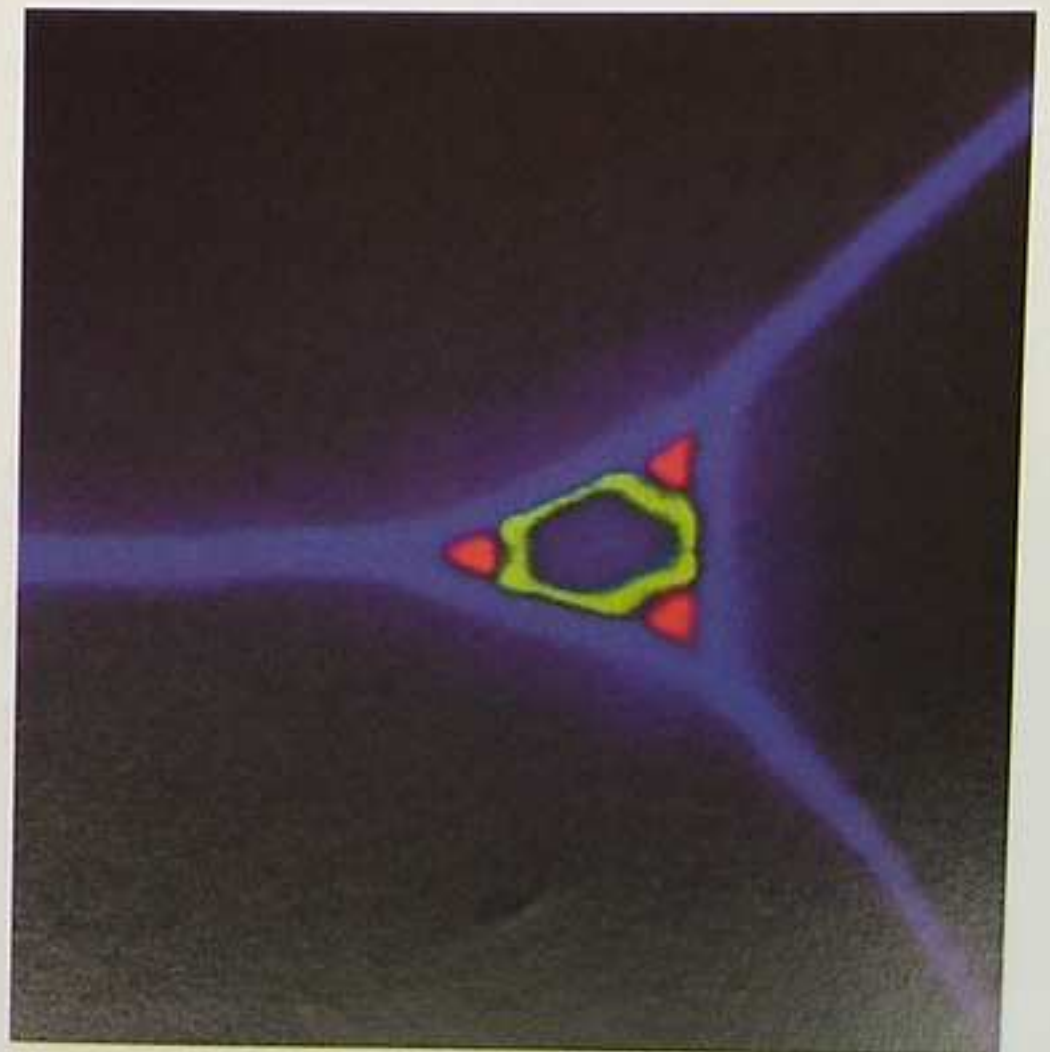



FIGURA 15.12 Seção do caule de tabaco marcada por tripla fluorescência, mostrando as paredes primárias de três células parenquimáticas adjacentes delimitando um espaço intercelular. A cor azul é dada pelo calcoflúor (corante de celulose) e as cores vermelha e verde indicam a ligação de dois anticorpos monoclonais a epitopos diferentes (regiões imunologicamente distintas) de homogalacturonano péctico (cedida por W. Willats).

Ca^{2+}, que forma um complexo firme com pectina. Assim, pode formar-se uma ampla rede com pontes de cálcio, conforme ilustra a Figura 15.13B.

As pectinas estão sujeitas a modificações que podem alterar a sua conformação e a ligação na parede. Muitos dos resíduos ácidos são esterificados com metil, acetil e outros grupos não-identificados durante a síntese no complexo de Golgi. Tal esterificação mascara as cargas de grupos carboxila e impede as ligações de cálcio entre pectinas, reduzindo, portanto, o caráter de gel da pectina.

Uma vez que a pectina é secretada para a parede, os grupos éster podem ser removidos por pectina esterases encontradas na parede, revelando, assim, as cargas dos grupos carboxila e aumentando a capacidade da pectina de formar um gel rígido. Pela criação de grupos carboxila livres, a desesterificação também aumenta a densidade de carga elétrica na parede, que, por sua vez, pode influenciar a concentração de íons na parede e as atividades de enzimas de parede. Além de serem conectadas por pontes de cálcio, as pectinas podem estar unidas entre si por diferentes ligações

(A) Estrutura do ramnogalacturonano I

Cadeias laterais de arabinano, galactano e arabinogalactano

Estrutura básica do ácido ramnose-galacturônico

Homogalacturonano

Segmentos não-ramificados

Segmentos altamente ramificados

(B) Ligação iônica de rede de pectina através do cálcio

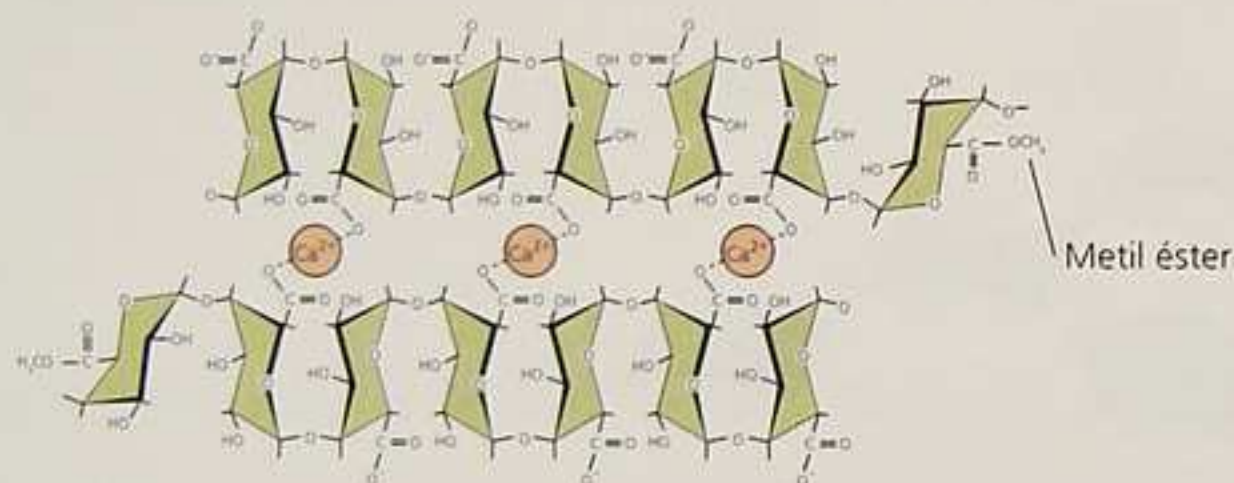
Metil éster

(C) Dímero de ramnogalacturonano II (RG II) com ligações cruzadas por pontes de diéster de borato

FIGURA 15.13 Estrutura da pectina. (A) Estrutura proposta de ramnogalacturonano I, contendo segmentos altamente ramificados intercalados com segmentos não-ramificados e uma estrutura básica de ramnose e ácido galacturônico. (B) A formação de uma rede de pectina envolve pontes iônicas, por meio de íons de cálcio, dos grupos carboxila (COO^-) não esterificados. Quando bloqueados por grupos metil-esterificados, os grupos carboxila não podem participar desse tipo formação de rede intercadeia. Da mesma forma, a presença de cadeias laterais na estrutura básica interfere na formação da rede. (C) Estrutura de ramnogalacturonano II (RG II) (B e C, de Carpita e McCann, 2000).

TABELA 15.2
Proteínas estruturais da parede celular

Classes de proteínas de parede celular	Porcentagem de carboidratos	Localização típica em:
HRGP (Glicoproteína rica em hidroxiprolina)	~55	Floema, câmbio, esclereídes
PRP (proteína rica em prolina)	~0-20	Xilema, fibras, córtex
GRP (proteína rica em glicina)	0	Xilema

covalentes, incluindo ligações éster entre resíduos fenólicos, como o ácido ferúlico (ver Capítulo 13).

As proteínas estruturais se tornam entrecruzadas na parede

Além dos polissacarídeos principais descritos na seção anterior, a parede celular contém várias classes de proteínas estruturais, as quais, em geral, são classificadas de acordo com sua composição predominante de aminoácidos — por exemplo, glicoproteína rica em hidroxiprolina (HRGP), proteína rica em glicina (GRP), proteína rica em prolina (PRP) e assim por diante (Tabela 15.2). Algumas proteínas de parede têm seqüências que são características de mais de uma classe. Muitas proteínas estruturais de paredes possuem estruturas primárias altamente repetitivas e, às vezes, também glicosiladas (Figura 15.14).

Estudos com extração *in vitro* têm mostrado que proteínas estruturais de parede recém-secretadas são relativamente solúveis, mas elas tornam-se cada vez mais insolúveis durante a maturação celular ou em resposta à lesão. Entretanto, não há certeza sobre a natureza bioquímica do processo de insolubilização.

As proteínas estruturais de parede variam bastante em sua abundância, dependendo do tipo de célula, maturação e estimulação prévia. Lesão, ataque de patógenos e tratamento com eliciadores (moléculas que ativam as respostas de defesa das plantas; ver Capítulo 13) aumentam a expressão dos genes que codificam muitas destas proteínas. Em estudos histológicos, as proteínas estruturais de parede com freqüência estão localizadas em células e tipos de tecidos específicos. As HRGPs, por exemplo, estão associadas sobretudo com câmbio, parênquima de floema e tipos variados de esclerênquima. As GRPs e PRPs estão mais seguidamente localizadas em vasos e fibras do xilema e, assim, são mais características de uma parede celular diferenciada.

Além das proteínas estruturais anteriormente listadas, as paredes celulares contêm **proteínas arabinogalactanas** (AGPs), em quantidade geralmente menor do que 1% da massa seca da parede. Essas proteínas hidrossolúveis são muito pesadamente glicosiladas: mais do que 90% da massa de AGPs pode ser de resíduos de açúcar — sobretudo, galactose e arabinose (Figura 15.15) (Gaspar e cols., 2001). Formas múltiplas de AGP são encontradas em tecidos vegetais, na parede ou associadas à membrana plasmática, manifestando padrões de expressão específicos de tecidos e células.

As AGPs podem funcionar na adesão celular e na sinalização durante a diferenciação da célula. Como evidência desta última idéia, o tratamento de culturas em suspensão com AGPs exógenas ou com agentes que se ligam especificamente às AGPs é referido como influência à proliferação celular e à embriogênese. As AGPs estão também implicadas no crescimento, nutrição e orientação de tubos polínicos via tecidos do estilete, assim com em outros processos de desenvolvimento (Cheung e cols., 1996; Gaspar e cols., 2001). Por fim, as AGPs podem também funcionar como um tipo de chaperona polissacarídica dentro de vesículas secretoras, para reduzir a associação espontânea de polissacarídeos recém-sintetizados até que sejam secretados para a parede celular.

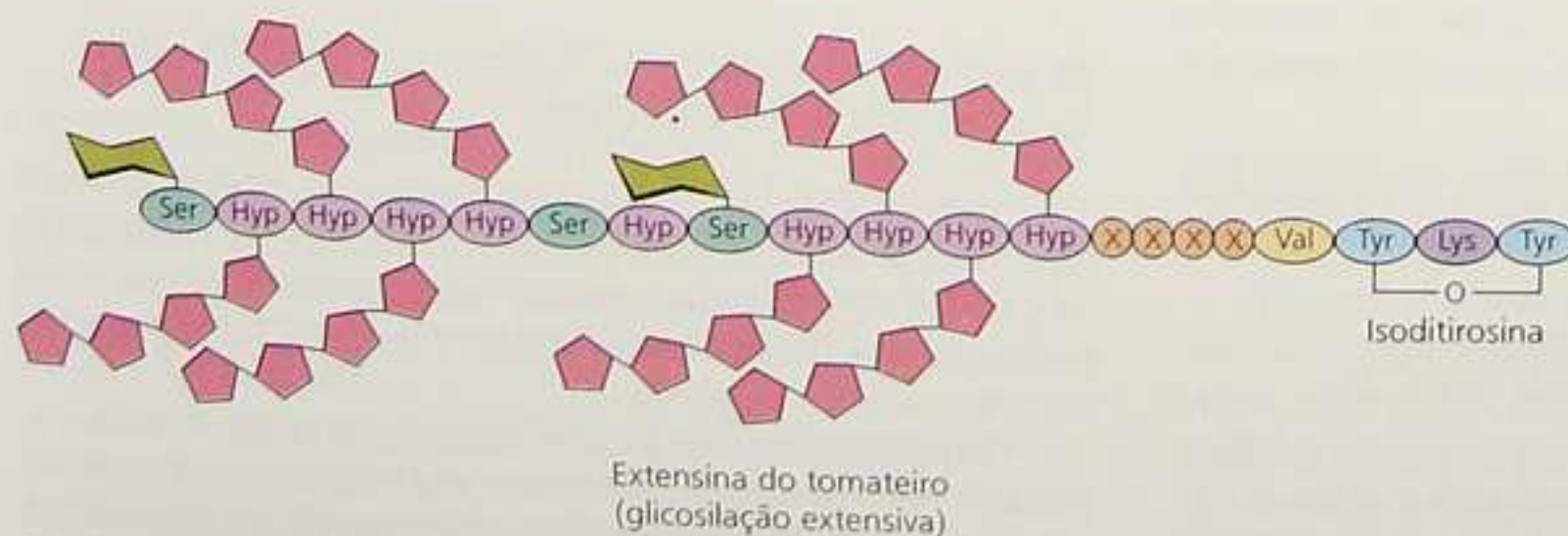



FIGURA 15.14 Uma representação repetida rica em hidroxiprolina de uma molécula de extensina do tomateiro, mostrando glicosilação extensiva e a formação de pontes intramoleculares de isoditirosina (Carpita e McCann, 2000).

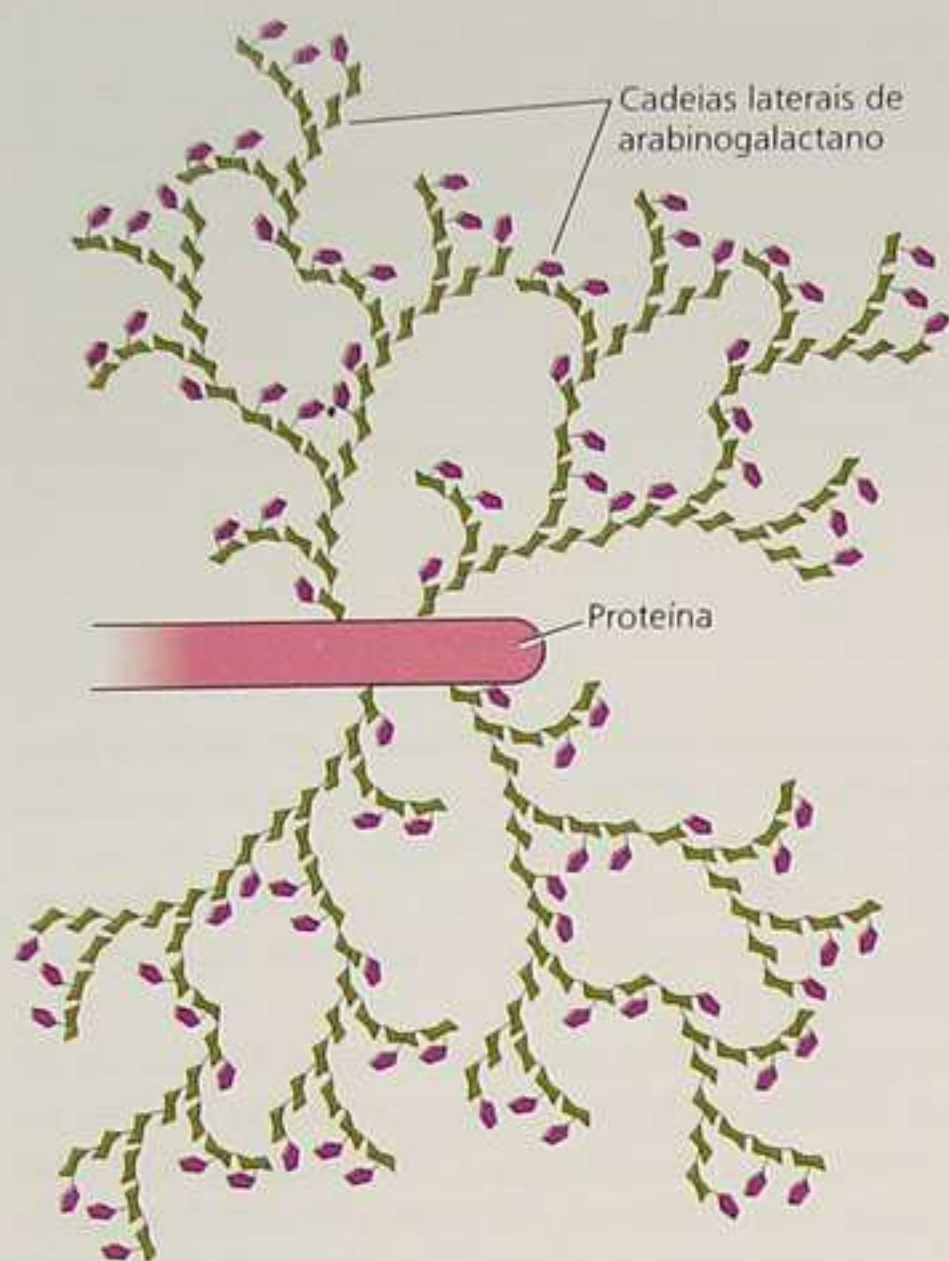



FIGURA 15.15 Uma molécula de arabinogalactano altamente ramificada (Carpita e McCann, 2000).

Novas paredes primárias são construídas durante a citocinese

As paredes primárias originam-se *de novo* durante os estádios finais da divisão celular, quando a **placa celular** recém-formada separa as duas células-filhas e solidifica-se em uma parede estável capaz de suportar uma carga física da pressão de turgor.

A placa celular forma-se quando as vesículas de Golgi e as cisternas do RE se agregam em um fuso na área da zona mediana de uma célula em divisão. Essa agregação é organizada pelo **fragmoplasto**, uma reunião complexa de microtúbulos, membranas e vesículas, formada durante o final da anáfase ou começo da telófase (ver Capítulo 1). As membranas das vesículas fusionam-se entre si e com a membrana plasmática lateral, formando a nova membrana plasmática que separa as células-filhas. Os conteúdos das vesículas são os precursores a partir dos quais são formadas a nova lamela média e a parede primária.

Após sua formação, a parede pode crescer e amadurecer por meio de um processo assim resumido:

Síntese → secreção → construção →
expansão (em células em crescimento) →
ligação cruzada e formação da parede secundária

A síntese e secreção dos principais polímeros de parede já foram descritas. Aqui, serão consideradas a construção e a expansão da parede.

Após sua secreção no espaço extracelular, os polímeros de parede precisam ser agrupados em uma estrutura coesa, isto é, os polímeros individuais devem alcançar o arranjo físico e as relações de vínculo característicos da parede. Embora os detalhes da construção da parede não sejam compreendidos, a autoconstrução e a construção mediada por enzimas são fundamentais no processo.

Autoconstrução. A autoconstrução é atraente porque seu mecanismo é simples. Os polissacarídeos de parede possuem uma manifesta tendência de se agregarem espontaneamente em estruturas organizadas. A celulose isolada, por exemplo, pode ser dissolvida em solventes fortes e, então, expelidas para formar fibras estáveis, denominadas raiom.

De maneira similar, as hemiceluloses podem ser dissolvidas em álcali forte; quando o álcali é removido, esses polissacarídeos agregam-se em redes concêntricas e ordenadas, que se assemelham à parede nativa em nível ultra-estrutural. Essa tendência em se agregar pode tornar tecnicamente difícil a separação da hemicelulose em seus polímeros. Por outro lado, as pectinas são mais solúveis e tendem a formar redes isotrópicas dispersas (géis). Tais observações indicam que os polímeros de parede têm uma capacidade inerente de se agregarem em estruturas parcialmente ordenadas.

Construção mediada por enzimas. Além da autoconstrução, as enzimas podem participar da reunião de parede. Um participante fundamental da construção da parede mediada por enzimas é a *xiloglucano endotransglicosilase* (*XET*). Essa enzima tem a capacidade de clivar a estrutura básica de um xiloglucano e juntar uma extremidade do xiloglucano cortado com a extremidade livre de um xiloglucano aceptor (Figura 15.16). Tal reação de transferência integra à parede xiloglucanos recentemente sintetizados (Nishitani, 1997; Thompson e Fry, 2001).

Outras enzimas que podem auxiliar na construção da parede incluem glicosidases, pectina metil esterases e diferentes oxidases. Algumas glicosidases removem as cadeias laterais de hemiceluloses. Essa atividade "desmembrante" aumenta a tendência de hemiceluloses de aderirem à superfície de microfibrilas de celulose. As pectinas metil esterases hidrolisam os metil ésteres que bloqueiam os grupos carboxila de pectinas. Pelo desbloqueio dos grupos carboxila, tais enzimas aumentam a concentração de grupos ácidos nas pectinas e acentuam a capacidade destas de formar uma rede gel com ligações de Ca^{2+}.

As oxidases, tal como a peroxidase, podem catalisar ligações cruzadas entre grupos fenólicos (tirosina, fenilalanina, ácido ferúlico) em proteínas de parede, pectinas e outros polímeros de parede. Tal acoplamento fenólico é importante para a formação de ligações cruzadas de lignina e pode igualmente unir componentes diferentes da parede.

As paredes secundárias se formam em algumas células após cessada a sua expansão

Após cessada a expansão das paredes, as células, às vezes, continuam a sintetizar uma parede, conhecida como secundária. As paredes secundárias são muitas vezes bastante espessas, como em traqueídes, fibras e outras células (Figura 15.17), servindo ao suporte mecânico da planta.

Freqüentemente, tais paredes secundárias possuem várias camadas e diferem da parede primária em estrutura e composição. As paredes secundárias na madeira, por exemplo, contêm xilanos em vez de xiloglucanos, bem como uma proporção mais alta de celulose. A orientação das microfibrilas de celulose pode ter um melhor alinhamento paralelo nas paredes secundárias que nas pri-

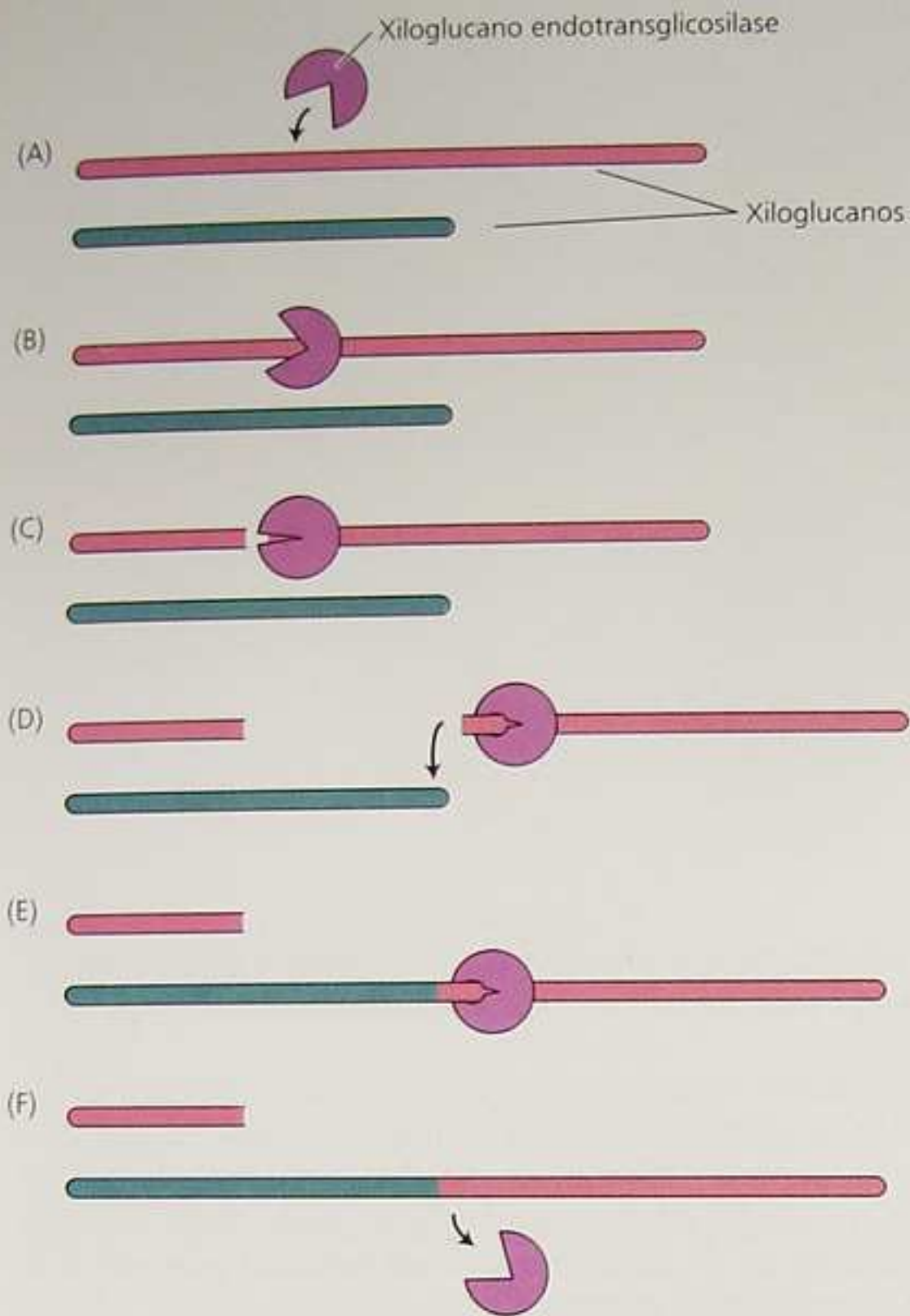



FIGURA 15.16 Atuação da xiloglucano endotransglicosilase (XET), clivando e unindo polímeros de xiloglucano em novas configurações. Em (A), são mostradas duas cadeias de xiloglucano com dois padrões distintos, para enfatizar seu novo arranjo. A XET liga-se ao meio de um xiloglucano (B), o cliva (C) e transfere uma extremidade para a extremidade de um segundo xiloglucano (D,E), resultando um xiloglucano mais curto e um mais longo (F) (Smith e Fry, 1991).

FIGURA 15.17 (A) Seção transversal de um esclereíde de *Podocarpus*, no qual são visíveis camadas múltiplas na parede secundária. (B) Diagrama da organização da parede celular, freqüentemente encontrada em traqueídes e outras células com paredes secundárias espessadas. Três camadas distintas (S_1, S_2, S_3) são formadas internamente à parede primária (fotografia © David Webb).

márias. As paredes secundárias são muitas vezes impregnadas com lignina.

A lignina é polímero fenólico com um padrão de ligações complexo e irregular, unindo as subunidades aromáticas de álcool (ver Capítulo 13). Tais subunidades, sintetizadas a partir da fenilalanina, são secretadas para a parede, onde são oxidadas no local apropriado pelas enzimas peroxidase e lacase. Como a lignina se forma na parede, ela remove água da matriz e constitui uma rede hidrofóbica, que se liga firmemente à celulose e impede a expansão da parede (Figura 15.18).

A lignina acrescenta uma resistência mecânica significativa às paredes celulares e reduz a sua suscetibilidade ao ataque de patógenos. A lignina reduz também a digestibilidade de material vegetal por animais. A engenharia genética do conteúdo e da estrutura da lignina pode melhorar a digestibilidade e o conteúdo nutricional de plantas usadas como forrageiras.

PADRÕES DE EXPANSÃO CELULAR

Durante o aumento da célula vegetal, novos polímeros de parede são continuamente sintetizados e secretados, ao mesmo tempo em que a parede preexistente se expande. A expansão da parede pode ser altamente localizada (como no caso do **crescimento apical**) ou uniformemente distribuída sobre toda a sua superfície (**crescimento difuso**) (Figura 15.19). Enquanto o crescimento apical é característico de pêlos de raízes e tubos polínicos (ver **Ensaio 15.1 na Internet**), a maioria das demais células do corpo da planta exibe crescimento difuso. As fibras, alguns esclereídes e tricomas cres-

Microfibrila de celulose (secção transversal)
Subunidade fenólica
Lignina formada por compostos fenólicos entrecruzados

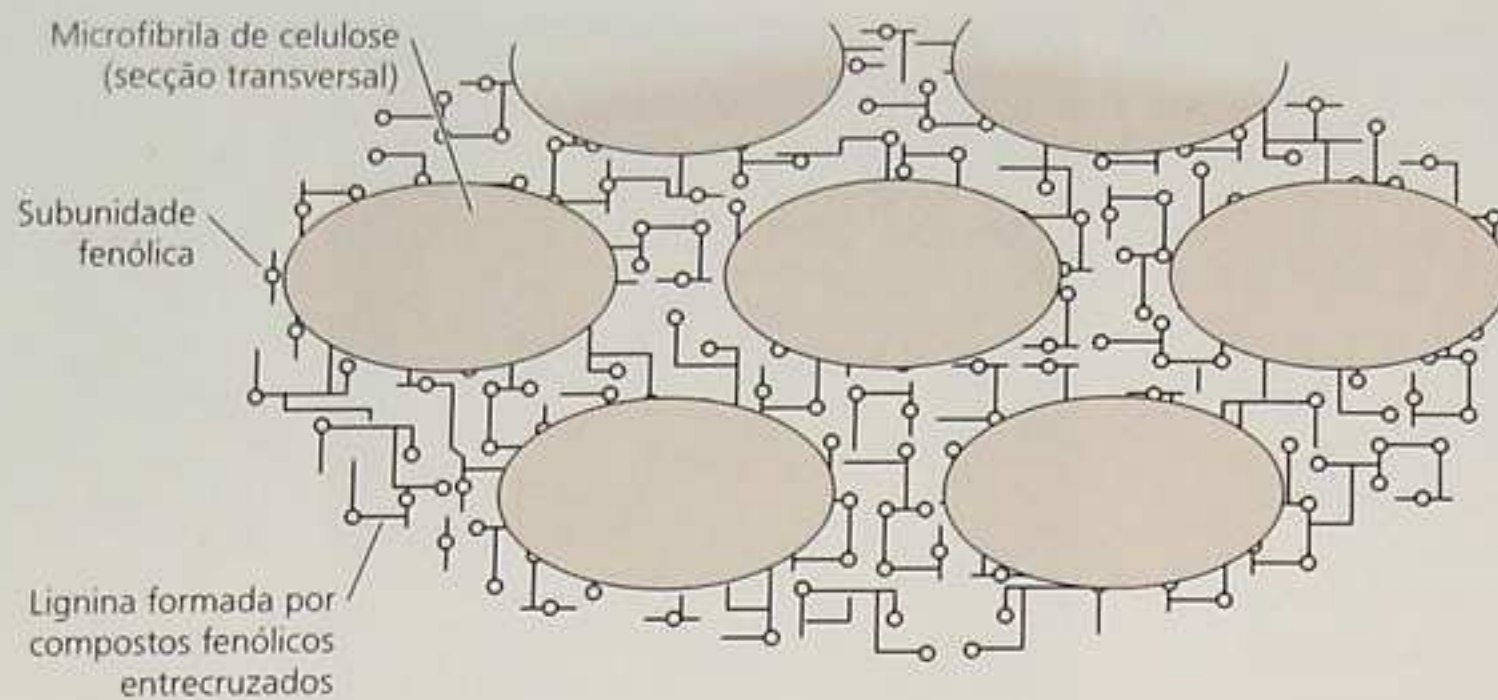
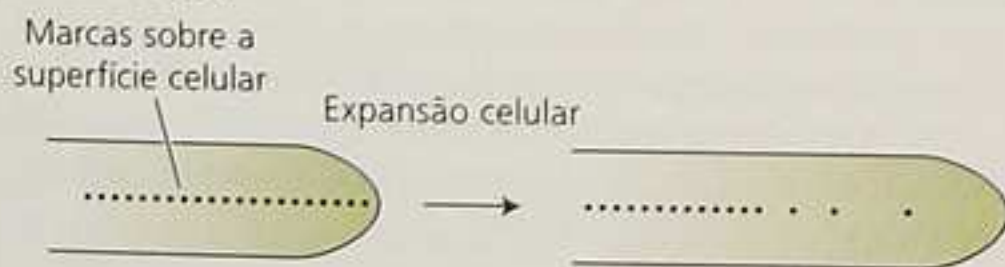



FIGURA 15.18 Diagrama ilustrando como as subunidades fenólicas de lignina infiltram-se nos espaços entre as microfibrilas de celulose, onde se tornam entrecruzadas (outros componentes da matriz são omitidos neste diagrama).

cem segundo um padrão que é intermediário entre o crescimento difuso e o apical.

Entretanto, mesmo em células com crescimento difuso, partes distintas da parede podem aumentar em taxas diferentes ou em direções diferentes. Em células corticais do caule, por exemplo, as paredes terminais crescem muito menos do que as paredes laterais. Essa diferença pode ser atribuída a variações estruturais ou enzimáticas em paredes específicas ou variações nos estresses inatos para paredes diferentes. Como conseqüência desse padrão desigual de expansão de parede, as células vegetais podem assumir formas irregulares.

(A) Crescimento apical
Marcas sobre a superfície celular
Expansão celular
(B) Crescimento difuso

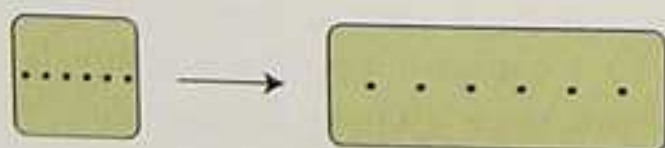



FIGURA 15.19 A superfície celular expande-se diferentemente durante os crescimentos apical e difuso. (A) A expansão de uma célula em crescimento apical está restrita a uma extremidade apical. Se forem colocadas marcas na superfície da célula e ela tem possibilidade de continuar a crescer, apenas as marcas que estavam inicialmente no ápice tornam-se afastadas. Os pêlos radiculares e os tubos polínicos são exemplos de células vegetais que exibem crescimento apical. (B) Se as marcas forem dispostas sobre a superfície de uma célula em crescimento difuso, a distância entre todas as marcas aumenta com o crescimento celular. A maioria das células de plantas multicelulares apresenta crescimento difuso.

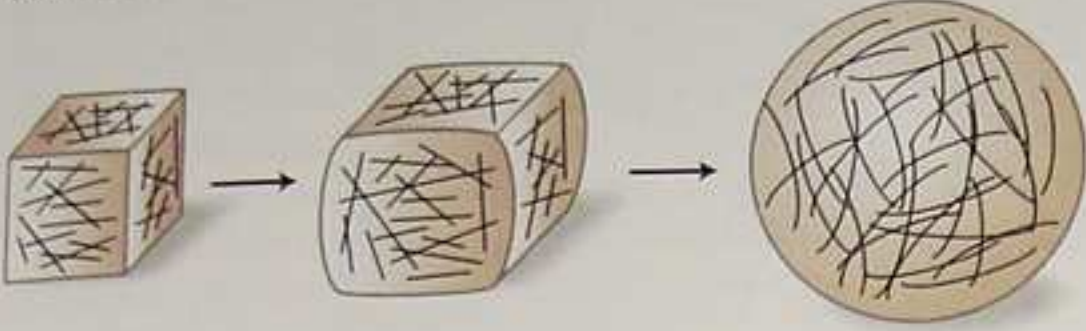
A orientação das microfibrilas determina a direção do crescimento de células com crescimento difuso

Durante o crescimento, a parede frouxa é estendida por forças físicas geradas da pressão de turgor da célula. A pressão de turgor cria uma força dirigida para fora, igual em todas as direções. Tal direção de crescimento é determinada, em grande parte, pela estrutura da parede celular — em particular, pela orientação de microfibrilas de celulose.

No começo da sua formação no meristema, as células são isodiamétricas, ou seja, elas têm diâmetros iguais em todas as direções. Se a orientação das microfibrilas de celulose na parede celular primária fosse **isotrópica** (com disposição aleatória), a célula cresceria igualmente em todas as direções, expandindo-se em direção radial e gerando uma esfera (Figura 15.20A). No entanto, na maioria das paredes celulares vegetais, a disposição das microfibrilas de celulose é **anisotrópica** (não-aleatória).

As microfibrilas de celulose são sintetizadas sobretudo nas paredes laterais de células cilíndricas em expansão, tais como as células corticais e vasculares de caules e raízes, ou de células entrenodais gigantes da alga verde filamentosa *Nitella*. Além disso, as microfibrilas de celulose são depositadas transversalmente nessas paredes laterais, em ângulos retos com o eixo longitudinal da célula. O arranjo transversal das microfibrilas de celulose é comparado ao de arcos em um barril, restringindo o crescimento em perímetro e promovendo o crescimento em comprimento (ver Figura 15.20B). Contudo, uma vez que as microfibrilas individuais de celulose, de fato, não formam arcos fechados ao redor da célula, uma analogia mais exata seria o arranjo de fibras de vidro.

A fibra de vidro é um *material composto complexo*, constituído de uma matriz amorfa de resina, fortalecida por elementos de reforço descontínuos, no caso fibras de vidro. Em compostos complexos, elementos cristalinos em forma de bastão exercem seu reforço máximo da matriz na direção paralela à sua orientação e seu reforço mínimo dá-se perpendicularmente à sua orientação. O reforço da parede é maior na direção paralela porque a matriz deve ajustar-se fisicamente ao longo de todo o comprimento das fibras para ocorrer o deslocamento lateral.

(A) Microfibrilas de celulose orientadas aleatoriamente

(B) Microfibrilas de celulose dispostas transversalmente

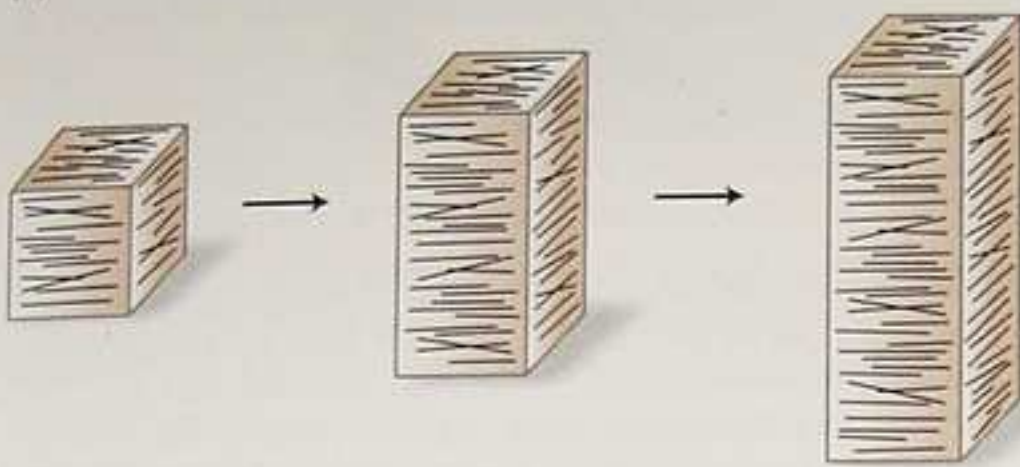



FIGURA 15.20 A orientação de microfibrilas de celulose recém-depositadas determina a direção da expansão celular. (A) Se a parede celular for reforçada por microfibrilas de celulose orientadas aleatoriamente, a célula irá se expandir igualmente em todas as direções, formando uma esfera. (B) Quando a maioria do reforço de microfibilas de celulose tem a mesma orientação, a expansão celular ocorre perpendicularmente à orientação das microfibrilas e é reprimida na direção do reforço. Nesse caso, a orientação da microfibrila é transversal, de modo que a expansão celular é longitudinal.

Por outro lado, quando o material é estendido na direção perpendicular, os polímeros da matriz necessitam apenas deslizar sobre os diâmetros dos elementos fibrosos, resultando em pouco ou nenhum fortalecimento da matriz. Por causa da disposição aleatória das fibras, a fibra de vidro é igualmente forte em todas as direções, ou seja, ela é mecanicamente isotrópica.

As paredes celulares, como as fibras de vidro, são materiais compostos complexos, constituídos de uma fase amorfa e elementos cristalinos (Darley e cols., 2001). No entanto, diferentemente da fibra de vidro, os elementos de reforço da microfibrila de uma parede celular primária típica são orientados transversalmente, fazendo com que a parede seja *anisotrópica* estrutural e mecanicamente. Por essa razão, as células vegetais em crescimento tendem a ser alongadas e aumentam apenas minimamente em perímetro.

O depósito de parede continua com a expansão da célula. De acordo com a **hipótese multirrede**, cada camada sucessiva de parede é estendida e afilada durante a expansão celular, de modo que as microfibrilas tornam-se passivamente reorientadas na direção longitudinal, isto é, na direção de crescimento. Assim, camadas sucessivas de microfibrilas mostram uma gradação em seu grau de reorientação através da espessura da parede; as microfibrilas das camadas externas são longitudinalmente orientadas, com resultado da extensão da parede (Figura 15.21).

Devido ao adelgaçamento e à fragmentação, essas camadas externas têm muito menos influência sobre a direção da expansão celular do que as camadas internas recentemente depositadas. Um quarto interno da parede suporta quase todo o estresse, devido à pressão de turgor, e determina a direção da expansão celular (ver **Tópico 15.4 na Internet**).

Os microtúbulos corticais determinam a orientação de microfibrilas recém-depositadas

As microfibrilas de celulose recém-depositadas e os microtúbulos citoplasmáticos em paredes celulares geralmente estão co-alinhados, sugerindo que os microtúbulos determinam a orientação do depósito dessas microfibrilas. A orientação de microtúbulos no citoplasma cortical (o citoplasma imediatamente adjacente à membrana plasmática) reflete, via de regra, a orientação das microfibrilas recém-depositadas na parede celular adjacente e ambos estão em geral co-alinhados na direção transversal, perpendicularmente ao eixo de polaridade (Figura 15.22). Em alguns tipos de células, como traqueídes, as microfibrilas na parede alternam orientações transversal e longitudinal, sendo em tais casos os microtúbulos paralelos às microfibrilas da camada de parede depositada mais recentemente.

A principal evidência do envolvimento de microtúbulos no depósito de microfibrilas de celulose é que a orientação das mesmas pode ser perturbada por mutações genéticas e certas drogas que rompem microtúbulos citoplasmáticos. Por exemplo, várias drogas ligam-se à tubulina, a subunidade protéica de microtúbulos, fazendo com que eles se despolimerizem. Quando raízes em crescimento são tratadas com uma droga que despolimeriza microtúbulos, como *orizalin*, a região de alongamento expande-se lateralmente, tornando-se bulbosa e semelhante a um tumor (Figura 15.23).

Esse crescimento rompido é devido à expansão isotrópica das células, ou seja, elas aumentam como uma esfera, em vez de se alongarem. A destruição de microtúbulos nas células em crescimento, induzida por droga, também rompe a orientação transver-

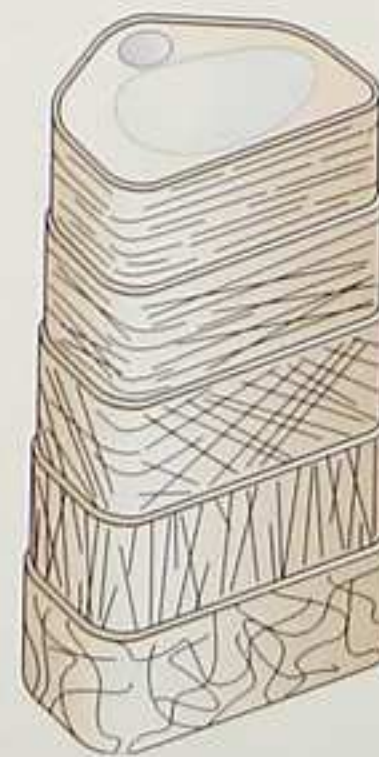



FIGURA 15.21 A hipótese multirrede para a extensão de parede. Microfibrilas de celulose recém-sintetizadas são continuamente depositadas, com orientação transversal, sobre a superfície interna da parede. Como ocorre alongamento celular, as camadas externas mais velhas são progressivamente adelgaçadas e enfraquecidas, sendo suas microfibrilas de celulose passivamente rearranjadas em uma orientação longitudinal. As propriedades mecânicas da parede são determinadas pelas camadas internas.

(A)

(B)

5 µm

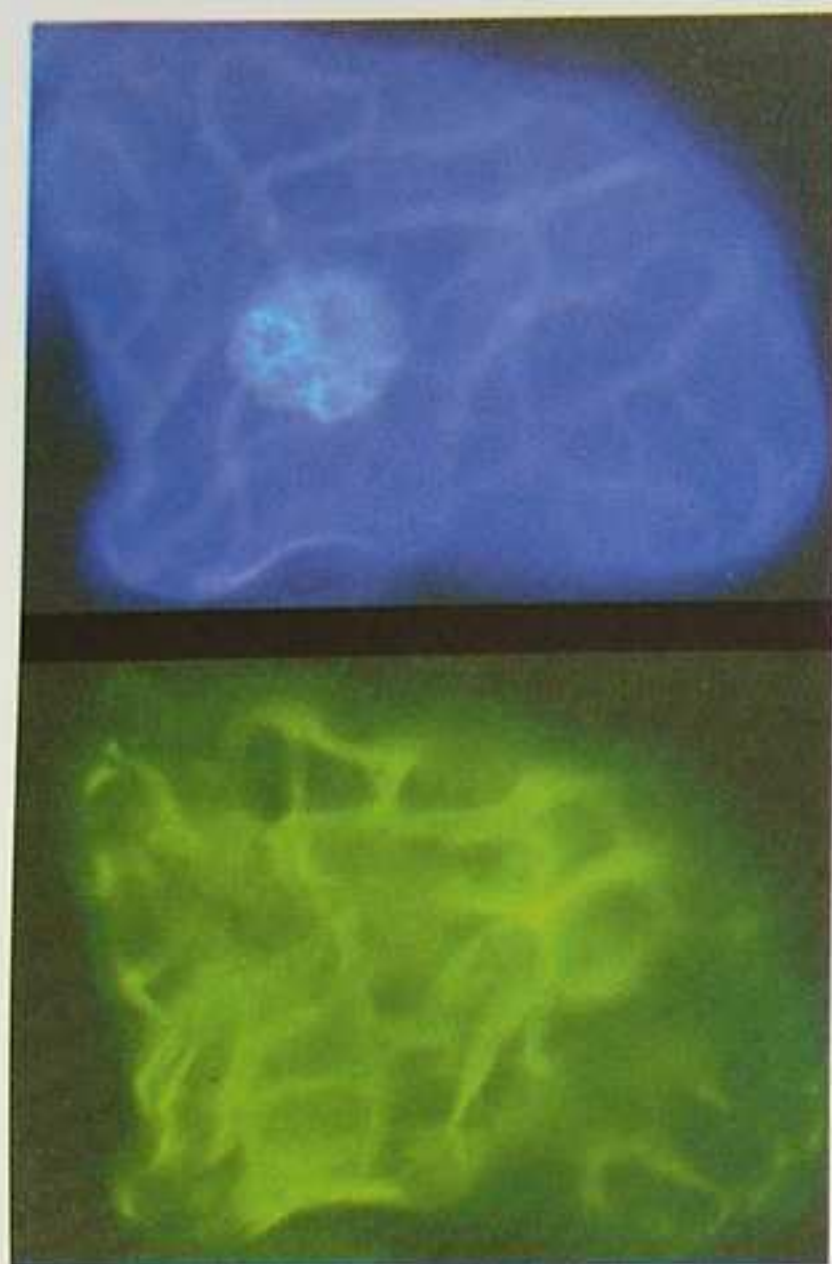
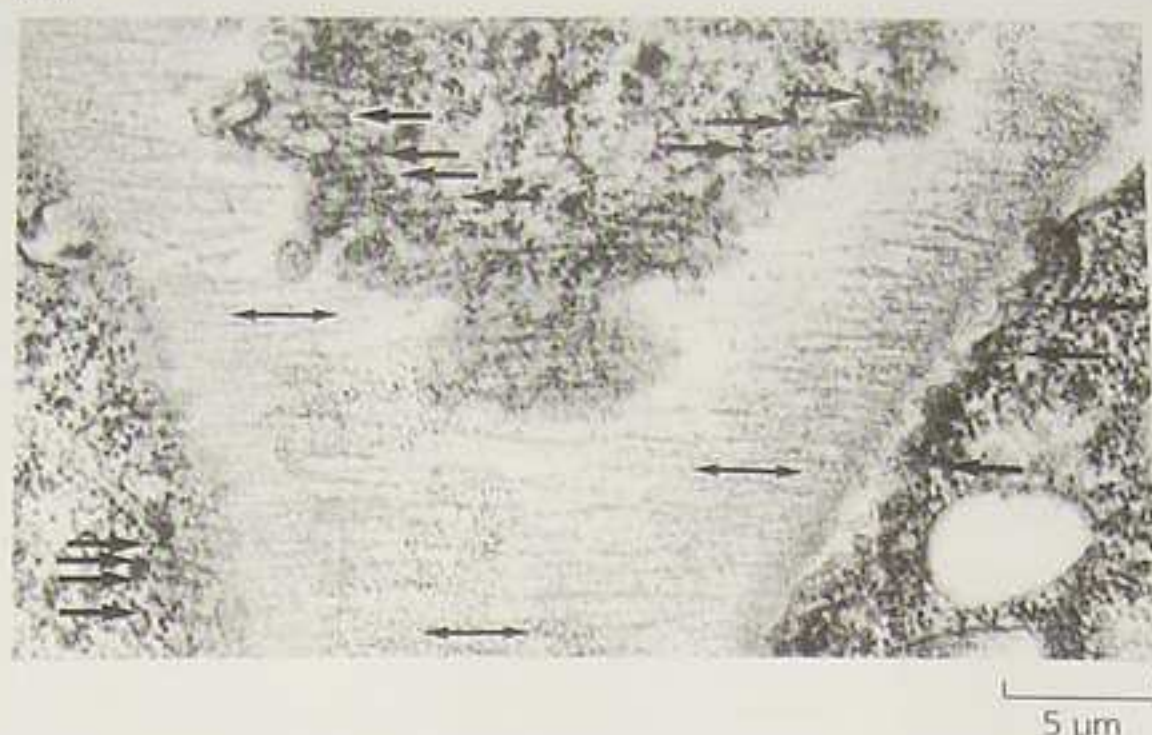



FIGURA 15.22 A orientação de microtúbulos no citoplasma cortical reflete a orientação de microfibrilas de celulose recém-depositadas na parede de células que estão em alongamento. (A) A disposição de microtúbulos pode ser revelada com anticorpos marcados para a tubulina sob fluorescência, a proteína de microtúbulo. Nesse elemento traqueal em diferenciação, de uma cultura de células em suspensão de *Zinnia*, o padrão de microtúbulos (verde) reflete a orientação das microfibrilas de celulose na parede, conforme mostrado pela coloração com calcoflúor (azul). (B) O alinhamento de microfibrilas de celulose na parede celular pode, às vezes, ser visto em secções preparadas para microscopia eletrônica, como nesta micrografia de um elemento de tubo crivado em desenvolvimento, de uma raiz de *Azolla* (uma pteridófita aquática). O eixo longitudinal da raiz e o elemento de tubo crivado correm verticalmente. As microfibrilas da parede (setas de duas pontas) e os microtúbulos corticais (setas de uma ponta) estão alinhadas trasnversalmente (A cedida por Robert W. Seagull e B, cedida por A. Hardham).

(A) Tratamento-controle (sem droga)

1 µM de *Orizalin*

(B) Tratamento-controle (sem droga)

1 µM de *Orizalin*

FIGURA 15.23 O rompimento de microtúbulos corticais provoca um drástico aumento na expansão celular radial e um concomitante decréscimo no alongamento. (A) Raiz de plântula de *Arabidopsis* tratada com *orizalin* (1 µM), a droga que despolimeriza microtúbulos, por dois dias antes de esta fotomicrografia ser feita. A droga alterou a polaridade de crescimento. (B) Os microtúbulos foram visualizadas por meio de uma técnica de imunofluorescência indireta e um anticorpo antitubulina. Enquanto os microtúbulos no controle estão orientados em ângulos retos em relação à direção do alongamento celular, muito poucos microtúbulos permanecem em raízes tratadas com 1 µM de orizalin (Baskin e cols., 1994, cedida por T. Baskin).

sal de microfibrilas de celulose nas camadas da parede depositadas mais recentemente. O depósito de parede celular continua na ausência de microtúbulos, mas as microfibrilas de celulose são depositadas aleatoriamente e as células se expandem de igual modo em todas as direções. Visto que as drogas antimicrotúbulo têm como alvo específico os microtúbulos, os resultados sugerem que os microtúbulos atuam como guias para a orientação do depósito de microfibrilas de celulose.

A TAXA DE ALONGAMENTO CELULAR

Antes de atingir a maturidade, as células tipicamente vegetais expandem-se de 10 a 100 vezes em volume. Em casos extremos, as células podem aumentar mais de 10.000 vezes em volume (p. ex., elementos de vaso). A parede celular sofre essa expansão profunda sem perder sua integridade mecânica e sem se tornar mais delgada. Assim, polímeros recém-sintetizados são integrados à parede sem desestabilizá-la. Ignora-se exatamente como essa integração é realizada, embora a autoconstrução e a xiloglucano endotransglicosilase (XET) desempenhem papéis importantes, conforme descrito.

Esse processo de integração pode ser sobremaneira crítico para pêlos radiculares de crescimento rápido, tubos polínicos e outras células especializadas que exibem crescimento apical, nas quais a região de depósito de parede e expansão superficial está localizada no ápice da célula semelhante a um tubo, e a expansão celular e o depósito de parede devem estar rigorosamente coordenados.

Em células que se desenvolvem rapidamente com crescimento apical, a parede duplica sua área de superfície e, em minutos, é deslocada para a parte da célula que não está se expandindo. Trata-se de uma taxa de expansão de parede muito maior do que é em geral encontrado em células com crescimento difuso; por isso, aquelas com crescimento apical são suscetíveis ao adelgaçamento e rompimento de paredes. Embora os crescimentos difuso e apical pareçam ter padrões distintos, ambos os tipos de expansão de parede devem ter processos análogos, senão idênticos, de integração de polímeros, relaxamento por estresse e deslizamento de polímeros de parede.

Muitos fatores influenciam a taxa de expansão de parede celular. O tipo e a idade da célula são importantes fatores de desenvolvimento. Da mesma forma, também o são os hormônios, como a auxina e a giberelina. As condições ambientais, como a luz e a disponibilidade de água, podem também modular a expansão celular. Tais fatores internos e externos provavelmente modificam a expansão celular pelo afrouxamento de parede, de modo que ela *cede* (esticamento irreversível). Nesse contexto, trata-se das *propriedades de cedência* da parede celular.

Nesta seção, serão examinados primeiramente os parâmetros biomecânicos e biofísicos que caracterizam as propriedades de amolecimento da parede. Para a expansão total da célula, a parede rígida precisa ser afrouxada de alguma maneira. O tipo de afrouxamento de parede envolvido na expansão celular vegetal é denominado *relaxamento do estresse*.

De acordo com a hipótese do crescimento ácido pela ação de auxina (ver Capítulo 19), um mecanismo que causa relaxamento do estresse da parede e da cedência da parede é a acidificação da parede celular, resultante de extrusão de prótons através da membrana plasmática. O afrouxamento da parede celular é intensificado em pH ácido. Um pouco adiante, serão abordados a base bioquímica do afrouxamento de parede induzido por acidez e o relaxamento do estresse, incluindo o papel de uma classe especial de proteínas de afrouxamento de parede, as chamadas *expansinas*.

Quando a célula aproxima-se do seu tamanho máximo, sua taxa de crescimento diminui e, por fim, cessa completamente. Ao final desta seção, será considerado o processo pelo qual a parede celular se enrijece, o que leva à cessação do crescimento.

O relaxamento do estresse da parede celular governa a absorção de água e o alongamento da célula

Visto que a parede celular é a principal barreira que limita a expansão da célula, muita atenção tem sido dispensada às suas propriedades físicas. Como um material polimérico hidratado, a parede celular vegetal tem propriedades físicas que são intermediárias entre aquelas de um sólido e as de um líquido. São as **propriedades viscoelásticas** ou **reológicas** (de fluxo). As paredes celulares em crescimento são, em geral, menos rígidas do que as paredes de células que não estão crescendo e, sob condições adequadas, elas exibem um esticamento ou **amolecimento** irreversível a longo prazo, ausente ou quase ausente em paredes que não estão em crescimento.

O *relaxamento do estresse* é um conceito decisivo para compreender como as paredes celulares aumentam (Cosgrove, 1997). O termo *estresse* é utilizado aqui no sentido mecânico, como força por unidade de área. Os estresses de parede surgem como uma conseqüência inevitável do turgor celular. A pressão de turgor em células vegetais em crescimento situa-se tipicamente entre 0,3 e 1,0 MPa. A pressão de turgor estende a parede celular e gera nela um estresse físico ou tensão de contrabalanço. Devido à geometria da célula (um grande volume pressurizado contido por uma parede delgada), esta tensão de parede é equivalente a 10 a 100 MPa de estresse tênsil — sem dúvida, um estresse muito grande.

Este simples fato tem conseqüências importantes para a mecânica do aumento celular. Enquanto as células animais podem mudar a forma em resposta a forças geradas pelo citoesqueleto, tais forças são desprezíveis, quando comparadas àquelas produzidas pelo turgor, que são contrabalançadas pela parede celular. Assim, para alterar a forma as células vegetais precisam controlar a direção e a taxa de expansão da parede, que elas realizam depositando celulose em uma orientação oblíqua (que determina a direção da expansão da parede) e por afrouxamento seletivo das ligações entre polímeros de parede celular. Esse afrouxamento bioquímico possibilita o deslizamento dos polímeros de parede, aumentando, com isso, a área de superfície da parede. Ao mesmo tempo, esse afrouxamento reduz o estresse físico na parede.

O relaxamento do estresse de parede é crucial, pois permite às células vegetais em crescimento a redução de seu turgor e de potenciais hídricos, o que as capacita a absorver água e a se expandir. Sem relaxamento do estresse, a síntese de parede apenas a espessaria, mas não a expandiria. Durante o depósito de parede secundária em células que não estão crescendo, não ocorre o relaxamento do estresse.

A taxa de expansão celular é governada por duas equações de crescimento

Quando as células vegetais aumentam antes da maturação, o incremento de volume é gerado principalmente por absorção de água, a qual é destinada sobretudo ao vacúolo, que sempre constitui a maior

parte do volume da célula madura. Aqui, será descrito como as células em crescimento regulam sua absorção de água e como essa absorção está coordenada com o amolecimento de parede.

A absorção de água por células em crescimento é um processo passivo. Não existem bombas de água ativas; em vez disso, a célula em crescimento é capaz de abaixar o potencial hídrico no seu interior, de modo que a água é absorvida espontaneamente em resposta à diferença de potencial hídrico, sem dispêndio direto de energia.

A diferença de potencial hídrico, $\Delta\Psi_w$ (expressa em megapascais) é definida como o potencial hídrico fora da célula menos o potencial hídrico dentro da célula (ver Capítulos 3 e 4). A taxa de absorção também depende da área de superfície da célula (A, em metros quadrados) e da permeabilidade da membrana plasmática à água (Lp, em metros por segundo por megapascal).

A membrana Lp é uma medida da rapidez com que a água atravessa a membrana e é uma função da estrutura física da membrana e da atividade de aquaporinas (ver Capítulo 3). Assim, tem-se a taxa de absorção de água em unidades de volume: $\Delta V/\Delta t$, expressa em metros cúbicos por segundo. Admitindo que uma célula em crescimento está em contato com água pura (com zero de potencial hídrico), então

$$\text{Taxa de absorção de água} = A \times Lp\,(\Delta\Psi_w) = A \times Lp\,(\Psi_o - \Psi_i) \qquad (15.1)$$

Esta equação indica que a taxa de absorção de água depende apenas da área da célula, permeabilidade da membrana à água, turgor celular e potencial osmótico.

A Equação 15.1 é válida para células em crescimento e para as que não estão em crescimento em água pura. Mas como se pode explicar o fato de as células em crescimento continuarem a absorver água por um tempo longo, enquanto as células que não estão em crescimento cessam a absorção de água?

Em uma célula que não está crescendo, a absorção de água aumenta o volume celular, fazendo com que o protoplasto seja empurrado com força contra a parede, aumentando, com isso, a pressão de turgor, Ψ_p. Esse aumento em Ψ_p rapidamente aumentaria o potencial hídrico da célula Ψ_w, levando $\Delta\Psi_w$ a zero. A absorção de água então cessaria.

Em uma célula em crescimento, $\Delta\Psi_w$ é impedida de alcançar o zero, pois a parede celular está "afrouxada": ela afrouxa irreversivelmente para as forças geradas pelo turgor e, por conseguinte, reduz ao mesmo tempo o estresse de parede e o turgor celular, processo denominado **relaxamento do estresse**, o qual é a diferença física decisiva entre células em crescimento e células que não estão crescendo.

O relaxamento do estresse pode ser compreendido como uma célula túrgida, na qual os componentes celulares pressionam contra a parede, fazendo com que esta se estenda elasticamente (i. é, de forma reversível), originando uma força contrária, um estresse de parede. Em uma célula em crescimento, o afrouxamento bioquímico permite à parede afrouxar não-elasticamente (de modo irreversível) o estresse de parede. Visto que a água é quase incompressível, uma expansão apenas infinitesimal da parede é necessária para reduzir a pressão de turgor celular e, ao mesmo tempo, o estresse de parede. Assim, *o relaxamento do estresse é uma diminuição no estresse de parede com quase nenhuma mudança nas suas dimensões.*

Como uma conseqüência do relaxamento do estresse de parede, o potencial hídrico da célula é reduzido e a água flui para o interior da célula, causando uma extensão mensurável da parede celular e aumento da área de superfície e do volume da célula. O crescimento continuado de células vegetais acarreta simultâneo relaxamento do estresse da parede (que tende a reduzir a pressão de turgor) e a absorção de água (que tende a aumentar a pressão de turgor).

A evidência empírica tem mostrado que o relaxamento e a expansão da parede dependem da pressão de turgor. Como o turgor é reduzido, o relaxamento da parede e o crescimento diminuem. O crescimento via de regra cessa antes que o turgor alcance zero. O valor de turgor no qual o crescimento cessa é denominado **limiar de cedência** (em geral representado pelo símbolo Y). Essa dependência da expansão da parede celular em relação à pressão de turgor é concretizada na seguinte equação:

$$GR = m(\Psi_p - Y) \qquad (15.2)$$

onde GR é a taxa de crescimento celular e m, o coeficiente que relaciona taxa de crescimento ao turgor em excesso do limiar de cedência. O coeficiente m é em geral chamado de **extensibilidade de parede** e *se constitui na inclinação da linha que relaciona taxa de crescimento à pressão de turgor*.

Sob condições de crescimento de estado estacionário, GR na Equação 15.2 corresponde à taxa de absorção de água na Equação 15.1. Isto significa que o aumento no volume da célula iguala o volume de água absorvida. As duas equações estão plotadas na Figura 15.24. Observe que ambos os processos de expansão de parede e absorção de água mostram reações que se opõem a uma mudança no turgor. Por exemplo, uma elevação no turgor aumenta a extensão da parede, mas reduz a absorção de água. Sob condições normais, o turgor está dinamicamente balanceado em uma célula em crescimento, exatamente no ponto de interseção das duas linhas. Nesse ponto, as duas equações são satisfeitas e a absorção de água é exatamente igual ao aumento do compartimento da parede.

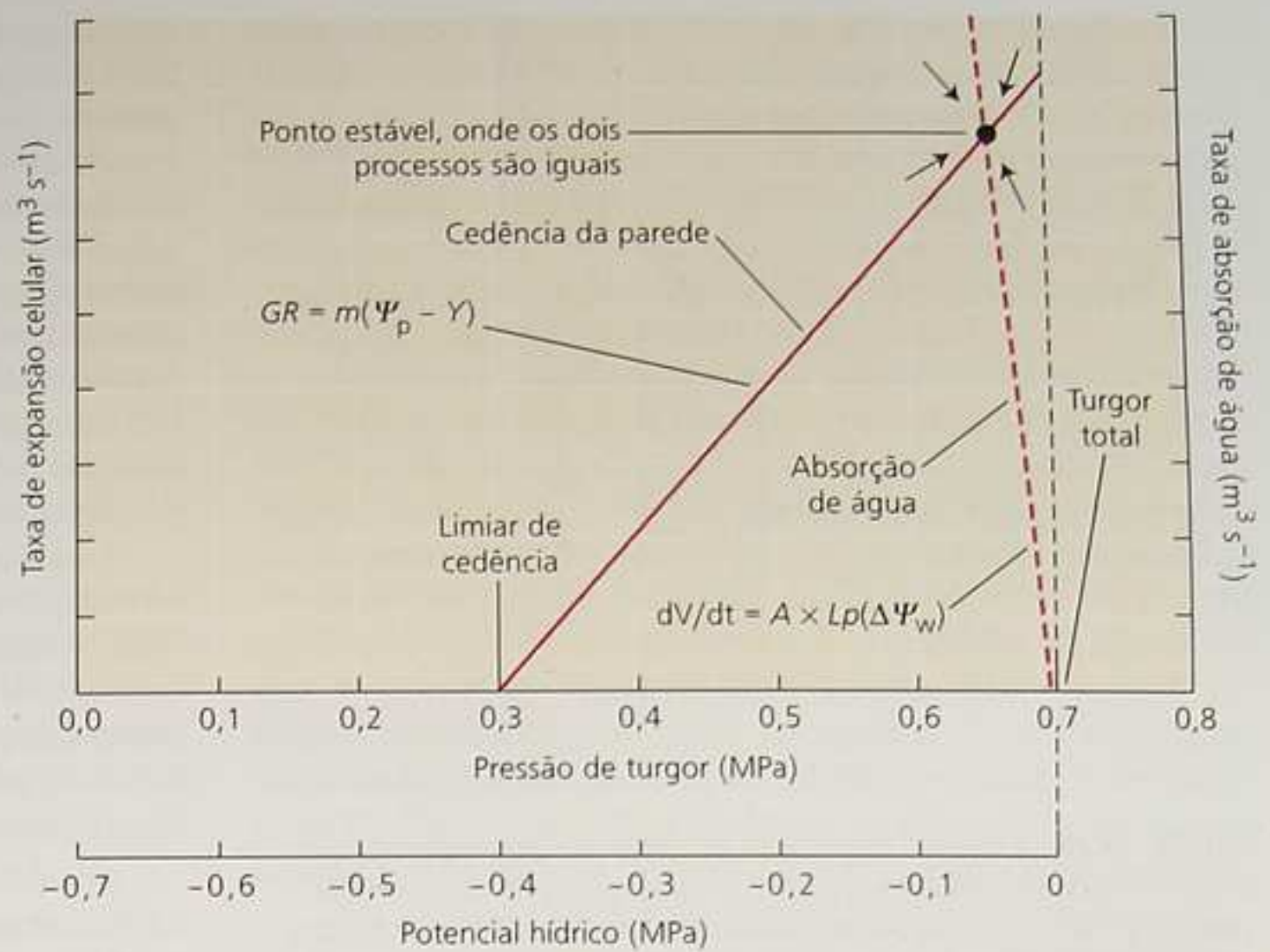
O ponto de interseção na Figura 15.24 é a condição de equilíbrio e qualquer desvio que nele ocorra provocará um desequilíbrio transitório entre os processos de absorção de água e expansão de parede. O resultado desses desequilíbrios é que o turgor retornará ao ponto de interseção, o ponto de equilíbrio dinâmico da célula em crescimento.

A regulação do crescimento celular — por meio de hormônios ou da luz, por exemplo — tipicamente é realizada pelo ajuste dos processos bioquímicos que regulam o afrouxamento da parede e relaxamento do estresse. Tais alterações podem ser medidas como uma mudança em m ou em Y.

A absorção da água, que é induzida pelo relaxamento do estresse da parede, amplia a célula e tende a devolver o estresse da parede e a pressão de turgor aos seus valores de equilíbrio, como foi mostrado. No entanto, se as células em crescimento são impedidas fisicamente de absorver água, o relaxamento da parede reduz de modo progressivo o turgor celular. Essa situação pode ser detectada, por exemplo, por meio de medições de turgor com uma *sonda de pressão* ou por medições potenciais com um *psicrômetro* ou uma *câmara de pressão* (ver **Tópico 3.6 na Internet**). A Figura 15.25 mostra o resultado de um desses experimentos.

O crescimento induzido por acidez é mediado por expansinas

Uma característica importante de paredes celulares em crescimento é que elas se estendem muito mais rápido no pH ácido do

FIGURA 15.24 Representação gráfica das duas equações que relacionam absorção de água e expansão celular à pressão de turgor e ao potencial hídrico da célula. Os valores das taxas de expansão celular e absorção de água são arbitrários. O equilíbrio do crescimento só é alcançado no ponto de interseção das duas equações. Qualquer desequilíbrio entre absorção de água e expansão da parede resultará em mudanças no turgor celular e levará a célula de volta ao ponto estável da interseção entre os dois processos.

que no neutro (Rayle e Cleland, 1992). Esse fenômeno é denominado **crescimento ácido**. Em material vivo, o crescimento ácido é evidente quando as células em crescimento são tratadas com tampões ácidos ou com a droga fusicocina, que induz acidificação da solução da parede celular por meio da ativação de uma H^+-ATPase na membrana plasmática.

Um exemplo de crescimento induzido por ácidos pode ser encontrado na iniciação do pêlo radicular, onde o pH local da parede cai para um valor de 4,5 no momento em que a célula epidérmica começa a se tornar protuberante (Bibikova e cols., 1998). O crescimento induzido por auxina também está associado à acidificação da parede, mas provavelmente ela não é suficiente para explicar toda a indução do crescimento por este hormônio (ver Capítulo 19) e outros processos de afrouxamento da parede podem estar envolvidos. Uma pesquisa recente, por exemplo, envolve a produção de radicais hidroxila no afrouxamento de parede durante o crescimento induzido por auxina (Schopfer, 2001). Contudo, tal mecanismo de extensão de parede dependente do pH parece ser um processo, conservado evolutivamente, comum a todas as plantas terrestres (Cosgrove, 2000) e envolvido em uma variedade de processos de crescimento.

O crescimento ácido pode ser observado também em paredes celulares isoladas, nas quais faltam os processos celular, metabólico e sintético normais. Essa observação exige o uso de um extensômetro, submetendo as paredes a uma tensão e medindo o **deslizamento de parede** pH-dependente (Figura 15.26).

O termo *deslizamento* refere-se a uma extensão irreversível dependente do tempo, tipicamente como resultado do escorregamento relativo de polímeros de parede. Quando as paredes em crescimento são incubadas em tampão neutro (pH7) e presas em um extensômetro, elas se estendem brevemente quando a tensão é aplicada, mas a extensão logo cessa. Quando transferida para um tampão ácido (pH 5 ou menor), a parede começa a estender-se de maneira rápida e em algumas ocasiões continua por muitas horas.

Tal deslizamento induzido por ácidos é característico de paredes de células em crescimento, mas não é observado em paredes maduras (que não estão em crescimento). Quando as paredes são pré-tratadas com calor, proteases e outros agentes que desnaturam proteínas, elas perdem a sua capacidade de crescimento ácido. Tais resultados indicam que o crescimento ácido não é devido simplesmente às características físicas e químicas da parede (p. ex., um enfraquecimento da gel pectina), mas catalisado por uma ou mais proteínas de parede.

FIGURA 15.25 Redução da pressão de turgor celular (potencial hídrico) por meio de relaxamento do estresse. Nesse experimento, os segmentos excisados de caule de plântulas de ervilha foram incubados em solução com ou sem auxina, depois secados e selados em uma câmara úmida. A pressão de turgor celular (P) foi medida em vários intervalos de tempo. Os segmentos tratados com auxina reduziram de modo rápido seu turgor a um limiar de cedência (Y), com resultado do rápido relaxamento da parede. Os segmentos sem auxina mostraram uma taxa de relaxamento mais lenta. Os segmentos-controle tiveram o mesmo tratamento do grupo tratado com auxina, exceto que eles permaneceram em contato com uma gota de água, que impediu o relaxamento da parede (Cosgrove, 1985).

Congelar, descongelar, raspar
Corte
Solução que pode ser tornada ácida
Transformador eletrônico mede a extensão
Força constante
Comprimento (mm)
pH 4.5
Tempo (horas)

FIGURA 15.26 Extensão de paredes celulares isoladas induzida por ácido e medida em um extensômetro. A amostra de parede de células mortas é presa e colocada sob tensão em um extensômetro, que mede o comprimento com um transformador eletrônico ligado a um grampo. Quando a solução que circunda a parede é removida com tampão ácido (p. ex., pH 4,5), a parede estende-se irreversivelmente em uma maneira dependente do tempo (ela desliza).

A idéia que proteínas são necessárias para o crescimento ácido foi confirmada em experimentos por reconstituição, nos quais paredes inativadas pelo calor foram restauradas, respondendo quase totalmente ao crescimento ácido pela adição de proteínas extraídas de paredes em crescimento (Figura 15.27). Os componentes ativos provaram ser um grupo de proteínas que foram denominadas **expansinas** (McQueen-Mason e cols., 1992; Li e cols., 1993). Tais proteínas catalisam a extensão pH-dependente e o relaxamento por estresse de paredes celulares. Elas são efetivas em quantidades catalíticas (cerca de uma parte de proteína por 5.000 partes de parede, por peso seco).

A base molecular da ação da expansina sobre a reologia da parede ainda é incerta, mas a maior evidência indica que as expansinas causam deslizamento da parede pelo afrouxamento da adesão não-covalente entre polissacarídeos de parede (Cosgrove, 2000; Li e Cosgrove, 2001). Os estudos sobre ligação sugerem que as expansinas podem atuar na interface entre celulose e uma ou mais hemiceluloses.

Com o conhecimento completo do genoma de *Arabidopsis*, hoje sabe-se que essa planta tem um conjunto grande de genes de expansina, dividido em duas famílias: α–expansinas e β-expansinas. Os dois tipos de expansinas agem sobre polímeros diferentes da parede celular (Cosgrove, 2000). As β-expansinas têm sido também encontradas em pólen de gramíneas, provavelmente ajudando o tubo polínico a penetrar no estigma e estilete (Li e Cosgrove, 2001).

As glucanases e outras enzimas hidrolíticas podem modificar a matriz

Vários tipos de experimentos envolvem β-(1→4)D-glucanases no afrouxamento de parede celular, em especial durante o alongamento da célula induzido por auxina (ver Capítulo 19). Por exemplo, glucanos da matriz, como o xiloglucano, mostram hidrólise acentuada e reposição (do inglês, *turnover*) em segmentos excisados, quando o crescimento é estimulado por auxina. A interferência com esta atividade hidrolítica por anticorpos ou lectinas reduz o crescimento em segmentos excisados.

A expressão de β-(1→4)D-glucanases está associada com tecidos em crescimento; a aplicação de glucanases em células *in vitro* pode estimular o crescimento. Tais resultados apóiam a idéia que

Plântula de pepino estiolada
Congelar, descongelar, raspar
Excisar a região de crescimento
Inativar com calor
Parede
Aplicação de proteína à parede
Transformador eletrônico mede a extensão
Homogeneizar
Recolher e lavar as paredes
Extrair paredes para solubilizar a proteína expansina
Força constante
Comprimento (%)
Adição de expansina
pH 4,5 tampão
Controle
Tempo

FIGURA 15.27 Esquema para a reconstituição da extensibilidade de paredes celulares isoladas. (A) As paredes celulares estão constituídas conforme a Figura 15.21 e brevemente aquecidas para inativar a resposta endógena de extensão ácida. Para recuperar esta resposta, são extraídas proteínas e paredes em crescimento e adicionadas à solução que circunda a parede. (B) A adição de proteínas contendo expansinas recupera as propriedades de extensão ácida da parede (segundo After Cosgrove, 1997.)

o relaxamento por estresse e a expansão de parede são o resultado direto da atividade de glucanases, que digerem xiloglucano em dicotiledôneas ou β-(1→3), 1→4)D-glucanos em paredes celulares de gramíneas (Hoson, 1993).

No entanto, a maioria das glucanases e hidrolases relacionadas à parede não provoca extensão de paredes da mesma maneira que as expansinas. Em vez disso, o tratamento de paredes com glucanases ou pectinases pode acentuar a resposta subseqüente de extensão a expansinas (Cosgrove e Durachko, 1994). As enzimas hidrolíticas de parede, como as β-(1→4)D-glucanases, sugerem que tais resultados não são os catalisadores principais de expansão de parede, mas podem agir indiretamente pela modulação do deslizamento de polímeros mediado por expansinas.

A xiloglucano endotransglicosilase também tem sido sugerida como uma enzima potencial de afrouxamento de parede. A XET auxilia na integração de xiloglucano recentemente secretado à estrutura de parede já existente, embora a sua função como um agente de afrouxamento de parede ainda seja especulativa.

Muitas mudanças estruturais acompanham o cessar da expansão da parede

A cessação do crescimento, que ocorre durante a maturação da célula, é, em geral, irreversível e tipicamente acompanhada por uma redução da extensibilidade da parede, medida por métodos biológicos variados. Essas mudanças físicas na parede podem acontecer por (1) uma redução nos processos de afrouxamento da parede, (2) um aumento de ligações cruzadas de parede ou (3) uma alteração na composição da parede, produzindo uma estrutura mais rígida ou menos suscetível ao afrouxamento da parede. Para cada uma dessas idéias existe alguma evidência (Cosgrove, 1997).

Várias modificações da parede em maturação podem contribuir para torná-la rígida:

- Os polissacarídeos da matriz recém-secretados podem ter a estrutura alterada, de modo a formar complexos mais firmes com celulose ou outros polímeros de parede, ou eles podem ser resistentes a atividades de afrouxamento da parede.
- A remoção de β-D-glucanos com ligações mistas é também coincidente com a cessação do crescimento nessas paredes.
- A desesterificação de pectinas, levando a géis de pectina mais rígidos, está similarmente associada à cessação do crescimento em gramíneas e dicotiledôneas.
- A ligação cruzada de grupos fenólicos na parede (tais como resíduos de tirosina em HRGPs, resíduos de ácido ferúlico ligados a pectinas e lignina) via de regra coincide com a maturação da parede e acredita-se ser mediada por peroxidase, uma enzima putativa na rigidez da parede.

Muitas mudanças estruturais ocorrem na parede durante e após a cessação do crescimento, sem a possibilidade, ainda, de identificar o significado de processos individuais para a cessação da expansão da parede.

DEGRAÇÃO DA PAREDE E DEFESA VEGETAL

A parede celular vegetal não é simplesmente um exoesqueleto inerte e estático. Além de atuar como uma barreira mecânica, a parede serve como uma matriz extracelular que interage com proteínas da superfície celular, fornecendo informação quanto à posição e ao desenvolvimento. Ela contém numerosas enzimas e moléculas menores que são biologicamente ativas e que podem modificar as suas propriedades físicas, às vezes em segundos. Em alguns casos, moléculas derivadas da parede podem atuar também como sinais celulares de informação de condições ambientais, como a presença de patógenos. Esse é um aspecto importante da resposta defensiva de plantas (ver Capítulo 13).

As paredes podem também ser substancialmente modificadas muito tempo depois de cessado o crescimento. Por exemplo, a parede celular pode ser bastante degradada, como ocorre no fruto em amadurecimento ou no endosperma de sementes em germinação. As lamelas médias das células que formam as zonas de abscisão de folhas e frutos (ver Capítulo 22) podem ser degradada seletivamente, resultando na separação das células. As células podem se separar seletivamente também durante a formação de espaços intercelulares, durante a emergência da raiz a partir de sementes em germinação e durante outros processos de desenvolvimento. Como uma forma de defesa, as células vegetais podem modificar suas paredes também durante o ataque de patógenos.

Nas seções a seguir, serão considerados dois tipos de mudanças dinâmicas que podem ocorrer em paredes celulares maduras: hidrólise e ligação cruzada oxidativa. Serão também discutidos como os fragmentos da parede celular, liberados durante o ataque de patógenos ou, mesmo, durante a reposição normal da parede celular, podem atuar como sinais celulares que influenciam o metabolismo e o desenvolvimento.

As enzimas são mediadoras da hidrólise e da degradação da parede

As hemiceluloses e as pectinas podem ser modificadas e quebradas por uma variedade de enzimas encontradas naturalmente na parede da célula. O processo tem sido estudado detalhadamente em frutos em amadurecimento, cujo amolecimento é considerado resultado da desagregação da parede (Rose e Bennett, 1999). Glucanases e enzimas afins podem hidrolisar a estrutura básica de hemiceluloses. Xilosidases e enzimas relacionadas podem remover os ramos laterais da estrutura básica de xiloglucano. Transglicosilases podem cortar e ligar hemiceluloses. Essas mudanças enzimáticas podem alterar as propriedades físicas da parede, por exemplo, pela mudança da viscosidade da matriz ou da alteração da tendência das hemiceluloses de se introduzirem na celulose.

RNAs mensageiros para expansina são expressos em fruto de tomateiro em amadurecimento, sugerindo que eles exercem um papel na desagregação de parede (Rose e cols., 1997). De modo semelhante, frutos em amolecimento expressam níveis altos de pectina metil esterase, que hidrolisa os ésteres de metil de pectinas. Essa hidrólise torna a pectina mais suscetível à hidrólise subseqüente por pectinas e enzimas afins, cuja presença, assim como a de enzimas afins na parede da célula, indica que as paredes são capazes de modificação significativa durante o desenvolvimento.

As rupturas oxidativas acompanham o ataque de patógenos

Quando as células vegetais são lesadas ou tratadas com certos eliciadores de baixo peso molecular (ver Capítulo 13), elas ativam uma resposta defensiva que resulta na produção de concentrações altas de peróxido de hidrogênio, radicais superóxidos e outras espé-

cies de oxigênio ativas na parede celular. Esta "ruptura oxidativa" parece fazer parte de uma resposta defensiva contra patógenos invasores (ver Capítulo 13) (Brisson e cols., 1994; Otte e Barz, 1996).

As espécies de oxigênio ativas podem atacar diretamente os organismos patogênicos e indiretamente deter a invasão subseqüente por organismos patogênicos, através de uma rápida ligação cruzada de componentes fenólicos da parede celular. Em caules de tabaco, por exemplo, proteínas estruturais da parede ricas em prolina tornam-se rapidamente insolubilizadas por lesão ou tratamento com eliciador, estando essa ligação cruzada associada com uma ruptura oxidativa e com um reforço mecânico das paredes celulares.

Os fragmentos de parede podem atuar como moléculas sinalizadoras

A degradação de paredes celulares pode resultar na produção de fragmentos de 10 a 15 resíduos, biologicamente ativos, denominados **oligossacarinas**, as quais podem estar envolvidas em respostas naturais de desenvolvimento e em respostas defensivas (ver **Tópico 15.5 na Internet**). Alguns dos efeitos fisiológicos e de desenvolvimento de oligossacarinas incluem a estimulação da síntese de fitoalexinas, rupturas oxidativas, síntese de etileno, despolimerização de membrana, mudanças no cálcio do citoplasma, síntese induzida de proteínas relacionadas a patógenos, como quitinase e glucanase, outros sinais de "lesão", sistêmicos ou localizados, e alterações no crescimento e na morfogênese de amostras isoladas de tecidos (John e cols., 1997).

Os melhores exemplos estudados são eliciadores de oligossacarídeos produzidos durante a invasão de patógenos (ver Capítulo 13). Por exemplo, o fungo *Phytophthora* secreta uma endopoligalacturonase (um tipo de pectinase) durante seu ataque sobre tecidos vegetais. Como esta enzima degrada o componente pectina da parede da célula da planta, ela produz fragmentos de pectina — **oligogalacturonanos** — que provocam respostas defensivas múltiplas por parte da célula vegetal (Figura 15.28). Os oligogalacturonanos, com comprimento de 10 a 13 resíduos, são os mais ativos nestas respostas.

As paredes de células vegetais contêm também uma β-D-glucanase, que ataca o β-D-glucano, específico da parede celular fúngica. Quando esta enzima ataca a parede celular fúngica, ela libera oligômeros de glucano com atividade eliciadora potente. Os componentes de parede servem, neste caso, como parte de um sistema sensitivo para a detecção de invasão patógena.

As oligossacarinas podem funcionar também durante o controle normal do crescimento e da diferenciação da célula. Por exemplo, constatou-se que um nonassacarídeo específico (um oligossacarídeo contendo nove resíduos de açúcar) derivado de xiloglucano inibe a promoção do crescimento pela auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). O nonassacarídeo atua a uma concentração ótima de 10^{-9} *M*. Esta oligossacarina xiloglucano pode atuar como um inibidor de crescimento por *feedback*; por exemplo, quando a clivagem de xiloglucano induzida por auxina é máxima, ela pode impedir o enfraquecimento excessivo da parede da célula. Há registros que oligômeros relacionados ao xiloglucano influenciam também a organogênese em culturas de tecidos e podem desempenhar um amplo papel na diferenciação celular (Creelman e Mullet, 1997).

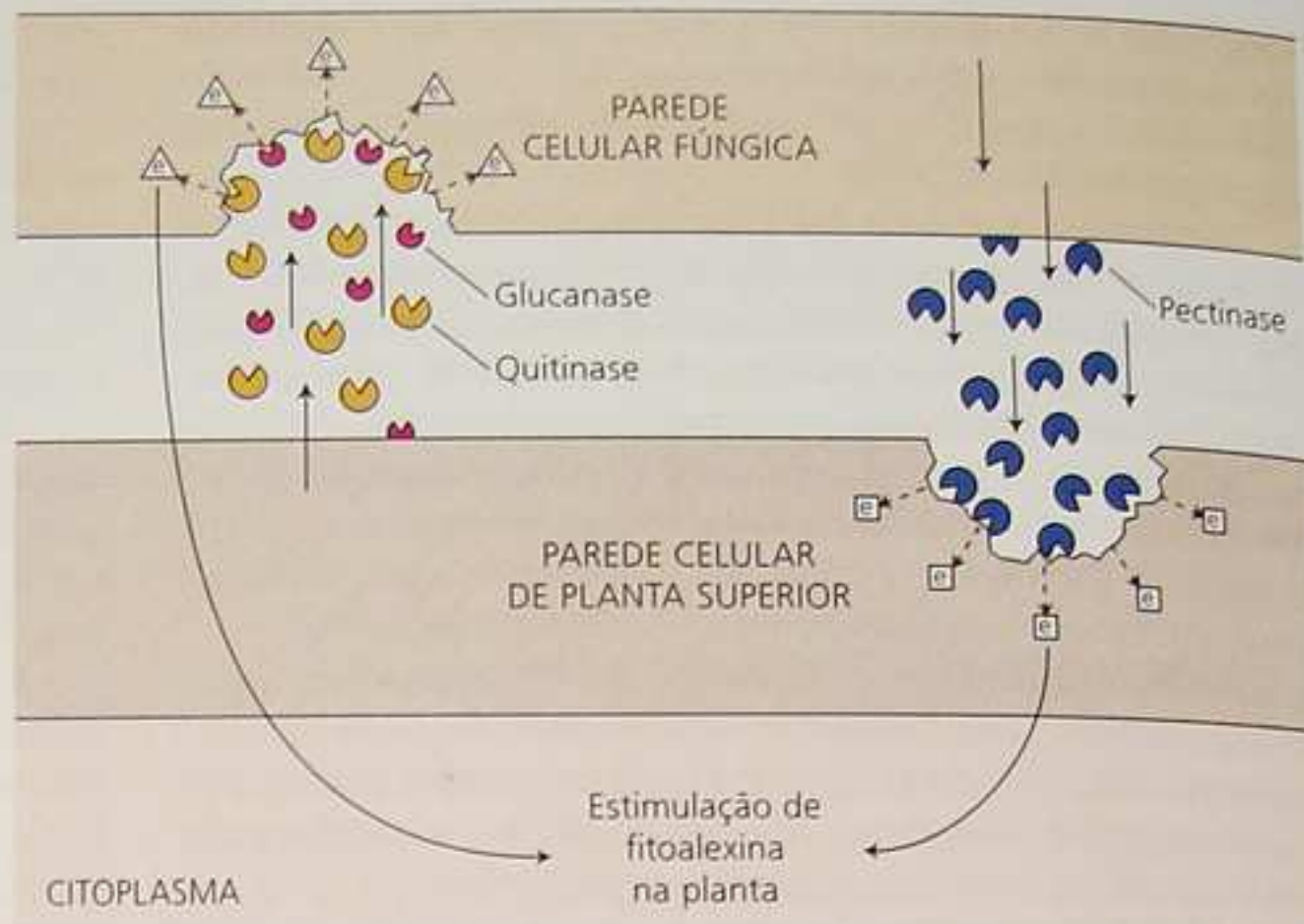



FIGURA 15.28 Esquema para a produção de oligossacarinas durante invasão fúngica de células vegetais. Enzimas secretadas pela planta, como quitinase e glucanase, atacam a parede fúngica, liberando oligossacarinas que provocam a produção de compostos de defesa (fitoalexinas) na planta. Similarmente, a pectinase fúngica libera oligossacarinas biologicamente ativas da parede celular da planta (Brett e Waidron, 1996).

RESUMO

A arquitetura, a mecânica e a função de plantas dependem decisivamente da estrutura da parede celular. A parede é secretada e reunida como uma estrutura complexa, que varia em forma e função, conforme a célula se diferencia. As paredes celulares primárias são sintetizadas em células crescendo ativamente e as secundárias são depositadas em certas células, como os elementos de vaso e esclerênquima, após cessar a sua expansão.

O modelo básico das paredes primárias é uma rede de microfibrilas de celulose implantada em uma matriz de hemiceluloses, pectinas e proteínas estruturais. As microfibrilas de celulose são arranjos de cadeias de glucano altamente ordenados, sintetizados sobre a membrana por complexos protéicos denominados rosetas de partículas. Os genes da celulose sintase em plantas têm sido recentemente identificados, permitindo saber que uma grande família de genes codifica esta e proteínas afins. A matriz é secretada para dentro da parede via complexo de Golgi. As hemiceluloses e proteínas entrecruzam microfibrilas, e as pectinas formam géis hidrofílicos que podem tornar-se entrecruzados por íons de cálcio. A construção da parede pode ser mediada por enzimas. Por exemplo, xiloglucano endotransglicosilase tem a capacidade de realizar reações de transglicosilação, que integram à parede xiloglucanos recém-sintetizados.

As paredes secundárias diferem das primárias por conterem uma percentagem mais alta de celulose, por terem hemiceluloses diferentes e porque a lignina substitui as pectinas na matriz. As paredes secundárias podem também se tornar altamente espessadas, ornamentadas e incrustadas com proteínas estruturais especializadas.

Em células com crescimento difuso, a direção do crescimento é determinada pela estrutura da parede, em particular a orientação das microfibrilas de celulose, que, por sua vez, é determinada

pela orientação de microtúbulos no citoplasma. As células jovens tipicamente apresentam uma grande alongamento. O aumento celular é limitado pela capacidade da parede celular de sofrer deslizamento de polímeros, que, por sua vez, é controlado de uma maneira complexa pela adesão de polímeros de parede entre si e pela influência do pH sobre as proteínas de afrouxamento de parede, como expansinas, glucanases e outras enzimas.

De acordo com a hipótese do crescimento ácido, a extrusão de prótons pela H^+-ATPase de membrana plasmática acidifica a parede, ativando a expansina. As expansinas induzem o relaxamento por estresse da parede pelo afrouxamento das ligações que mantêm as microfibrilas juntas. A cessação do alongamento celular parece ser devido ao processo de endurecimento da parede causado por um aumento no número de ligações cruzadas.

As enzimas hidrolíticas podem degradar completa ou seletivamente paredes celulares maduras durante o amadurecimento do fruto, germinação da semente e formação de camadas de abscisão. As paredes celulares podem também sofrer ligação cruzada oxidativa, em resposta ao ataque de patógenos. Além disso, o ataque de patógenos pode liberar fragmentos de parede celular; certos fragmentos de parede têm se mostrado capazes de atuar como agentes de sinalização celular.

Material da Internet

Tópicos da Internet

15.1 Terminologia da química de polissacarídeos
É fornecida uma breve revisão de termos usados para descrever as estruturas, ligações e polímeros na química de polissacarídeos.

15.2 Modelo molecular para a síntese de celulose e outros polissacarídeos de parede que consistem de uma repetição de dissacarídeo
É apresentado um modelo para a polimerização de unidades de celulose em cadeias de glucano, por meio da enzima celulose sintase.

15.3 Componentes da matriz da parede de celulose
A secreção de xiloglucano e proteínas glicosiladas pelo Golgi pode ser demonstrada em nível ultra-estrutural.

15.4 As propriedades mecânicas de paredes celulares: Estudos com *Nitella*
São descritos experimentos, demonstrando que a parte interna, correspondente a 25% da parede celular, determina a direção da expansão da célula.

15.5 Estrutura de oligossacarinas biologicamente ativas
Tem sido demonstrado que alguns fragmentos de parede celular possuem atividade biológica.

Ensaio da Internet

15.1 Gradientes de cálcio e oscilações em tubo polínico em crescimento
É descrito o papel do cálcio na regulação do crescimento apical do tubo polínico.

Referências bibliográficas

Amor, Y, Haigler, C. H., Johnson, S., Wainscott, M., and Delmer, D. P (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9353-9357.

Arioli, T., Peng, L., Betzner, A. S., Burn, J., Wittke, W., Herth, W., Camilleri, C., Hofte, H., Plazinski, J., Birch, R., Cork, A., Glover, J., Redmond, J., Williamson, R. E. (1998) Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arapidopsis*. *Science* 279: 717-720.

Baskin, T. I., Wilson, J. E., Cork, A., and Williamson, R. E. (1994) Morphology and microtubule organization in *Arabidopsis* roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant Cell Physiol.* 35: 935-942.

Bibikova, T. N., Jacob, T., Dahse, I., and Gilroy, S. (1998) Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 2925-2934.

Brett, C. T., and Waldron, K. W. (1996) *Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls*, 2nd ed. Chapman and Hall, London.

Brisson, L. E, Tenhaken, R., and Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6:1703-1712.

Brown, R. M., Jr., Saxena,1. M., and Kudlicka, K. (1996) Cellulose biosynthesis in higher plants. *Trends Plant Sci.* 1: 149-155.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. L., eds. (2000) *Biochemistry, and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiologists, Rockville, MD.

Carpita, N. C. (1996). Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 455-176.

Carpita, N. C., and McCann, M. (2000) The cell wall. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones, eds., American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, pp. 52-108.

Cheung, A. Y Zhan, X. Y, Wang, H., and Wu, H.-M. (1996) Organspecific and Agamous-regulated expression and glycosylation of a pollen tube growth-promoting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3853-3858.

Cosgrove, D. J. (1985) Cell wall yield properties of growing tissues. Evaluation by in vivo stress relaxation. *Plant Physiol.* 78: 347-356.

Cosgrove, D. J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* 9:1031-1041.

Cosgrove, D. J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407: 321-326.

Cosgrove, D. J., and Durachko, D. M. (1994) Autolysis and extension of isolated walls from growing cucumber hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 45:1711-1719.

Creelman, R. A., and Mullet, J. E. (1997) Oligosaccharins, brassinolides, and jasmonates: Nontraditional regulators of plant growth, development, and gene expression. *Plant Cell* 9:1211-1223.

Darley, C. P, Forrester, A. M., and McQueen-Mason, S. J. (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol. Biol.* 47: 179-195.

Delmer, D. P, and Amor, Y (1995) Cellulose biosynthesis. *Plant Cell* 7:987-1000.

Gaspar, Y, Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A., and Schultz, C. J. (2001) The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol. Biol.* 47: 161-176.

Gunning, B. S., and Steer, M. W. (1996) *Plant Cell Biology: Structure and Function*. Jones and Bartlett Publishers, Boston.

Hayashi, T. (1989) Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 139-168.

Holland, N., Holland, D., Helentjaris, T., Dhugga, K. S., XoconostleCazares, B. and Delmer D. P (2000) A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family. *Plant Physiol.* 123: 1313-1324.

Hoson, T. (1993) Regulation of polysaccharide breakdown during auxin-induced cell wall loosening. *J. Plant Res.* 103: 369-381.

Ishii, T., Matsunaga, T., Pellerin, P., O'Neill, M. A., Darvill, A., and Albersheim, P (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 274: 13098-13104.

John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Walden, R., and Schell, J. (1997) Cell signalling by oligosaeeharides. *Trends Plant Sci.* 2: 111-115.

Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X. J., Linder, C. R., and Brown, R. M., Jr. (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell* 11: 2075-2085.

Li, L.-C., and Cosgrove, D. J. (2001) Grass group I pollen allergens (beta-expansins) lack proteinase activity and do not cause wall loosening via proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 268: 4217-4226.

Li, Z.-C., Durachko, D. M., and Cosgrove, D. J. (1993) An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191: 349-356.

McCann, M. C., Wells, B., and Roberts, K. (1990) Direct visualization of cross-links in the primary plant cell wall. *J. Cell Sci.* 96: 323-334.

McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., and Cosgrove, D. J. (1992) Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants. *Plant Cell* 4: 1425-1433.

Nishitani, K. (1997) The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. *In t. Rev. Cytol.* 173: 157-206.

O'Neill, M. A., Eberhard, S., Albersheim, P, and Darvill, A. G. (2001) Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science* 294: 846-849.

Otte, O., and Barz, W. (1996) The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* 200: 238-246.

Pear, J. R., Kawagoe, Y., Schreckengost, W. E., Delmer, D. P., and Stalker, D. M. (1996) Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12637-12642.

Peng, L., Kawagoe, Y, Hogan, P, and Delmer, D. (2002) Sitosterol-β-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science* 295: 147-148.

Rayle, D. L., and Cleland, R. E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.* 99: 1271-1274.

Richmond, T. A., and Somerville, C. R. (2000) The cellulose synthase superfamily. *Plant Physiol.* 124: 495-498.

Roland, J. C., Reis, D., Mosiniak, M., and Vian, B. (1982) Cell wall texture along the growth gradient of the mung bean hypocotyl: Ordered assembly and dissipative processes. *J. Cell Sci.* 56: 303318.

Rose, J. K. C., and Bennett, A. B. (1999) Cooperative disassembly of the cellulose-xyloglucan network of plant cell walls: Parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends Plant Sci.* 4: 176-183.

Rose, J. K. C., Lee, H. H., and Bennett, A. B. (1997) Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 5955-5960.

Salnikov, V V, Grimson, M. J., Delmer, D. P., and Haigler, C. H. (2001) Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry* 57: 823-833.

Schopfer, P (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: Implications for the control of elongation growth. *Plant J.* 28: 679-688.

Sene, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H., and Grinter, R. (1994) Fourier-transform Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy. An investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiol.* 106: 1623-1631.

Smith, R. C., and Fry, S. C. (1991) Endotransglycosylation of xyloglucans in plant cell suspension cultures. *Biochem. J.* 279: 529-536.

Thompson, J. E., and Fry, S. C. (2001) Restructuring of wall-bound xyloglucan by transglycosylation in living plant cells. *Plant J.* 26: 23-34.

Wilson, R. H., Smith, A. C., Kacurakova, M., Saunders, P K., Wellner, N., and Waldron, K. W (2000) The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiol.* 124: 397-405.

Capítulo

16 Crescimento e desenvolvimento

A FASE VEGETATIVA DO DESENVOLVIMENTO inicia com a embriogênese, mas continua durante toda a vida da planta. Biologistas do desenvolvimento vegetal estão preocupados em saber como o zigoto origina um embrião e este, uma plântula. Como novas estruturas vegetais surgem a partir de estruturas preexistentes? Os órgãos são originados por divisão celular e expansão, mas são também compostos por tecidos, nos quais grupos de células adquirem funções especializadas, e esses tecidos se organizam em padrões específicos. Como tais tecidos formam um padrão particular e como as células se diferenciam? Que princípios básicos governam o aumento de tamanho (crescimento) que ocorre ao longo do desenvolvimento vegetal?

O objetivo final dos biologistas do desenvolvimento é compreender como o crescimento, a diferenciação celular e o padrão de formação são regulados em níveis celular, bioquímico e molecular. Tal compreensão deve também incluir as bases genéticas do desenvolvimento. Finalmente, este é a revelação dos programas geneticamente codificados. Quais os genes envolvidos, qual a ordem hierárquica e como dão origem a mudanças no desenvolvimento?

Neste capítulo, será explorado o que é conhecido sobre tais questões, começando com a embriogênese. A embriogênese inicia o desenvolvimento da planta, mas, diferentemente dos animais, é um processo contínuo, estabelecendo o plano básico do corpo vegetal e formando os meristemas que geram os órgãos adicionais no adulto.

Após a discussão da formação do embrião, serão examinados os meristemas da raiz e da parte aérea. A maior parte do desenvolvimento vegetal é pós-embrionária e ocorre a partir dos meristemas, os quais podem ser considerados fábricas celulares onde os processos em andamento de divisão celular, expansão e diferenciação geram o corpo vegetal. As células derivadas dos meristemas tornam-se os tecidos e os órgãos que determinam o tamanho, a forma e a estrutura definitivos da planta.

Os meristemas vegetativos são altamente repetitivos, produzindo a mesma ou similar estrutura reiteradas vezes, podendo sua atividade continuar indefinidamente, fenômeno conhecido como *crescimento indefinido*. Algumas árvores perenes, como os pinheiros, por exemplo, continuam a crescer por milhares de anos. Outras, particularmente as plantas anuais, cessam seu crescimento vegetativo com o início da floração, após uma ou poucas semanas ou meses de crescimento. Eventualmente, a planta adulta submete-se a uma transição do desenvolvimento vegetativo ou reprodutor, culminando com a

produção de um zigoto, reiniciando-se o processo, que será discutido no Capítulo 24.

As células derivadas do meristema apical apresentam um padrão específico de expansão, o qual determina a forma e o tamanho definitivos da planta. Após a discussão sobre os meristemas, será examinado como se analisa o crescimento vegetal, com ênfase nos padrões de crescimento no espaço (relacionado à estrutura da planta) e no tempo (quando ocorrem os eventos).

Finalmente, apesar de seu hábito de crescimento indeterminado, as plantas, como todos os demais organismos multicelulares, senescem e morrem. Ao final do capítulo, será considerada a morte como um fenômeno do desenvolvimento, tanto em nível celular quanto do organismo. Para uma revisão histórica do estudo do desenvolvimento vegetal, ver o **Ensaio 16.1 na Internet**.

EMBRIOGÊNESE

A **embriogênese** é o processo que inicia o desenvolvimento vegetal. Embora a embriogênese geralmente tenha início com a união do gameta com a oosfera, formando uma célula única denominada *zigoto*, células somáticas também podem sofrer embriogênese sob condições especiais. A fecundação também começa três outros programas de desenvolvimento: o endosperma, a semente e o fruto. Será focado a embriogênese porque ela proporciona a chave para a compreensão do desenvolvimento vegetal.

A embriogênese transforma uma célula única chamada de zigoto em uma planta multicelular, microscópica, embrionária. Um **embrião** completo tem o corpo básico de uma planta madura e muitos dos tipos de tecidos do adulto, embora presentes de forma rudimentar.

A **dupla fecundação** é uma característica única das plantas com flores (ver **Tópicos 1.1** e **1.2 na Internet**)*. Em plantas, como em todos os demais eucariontes, a união de um gameta com a oosfera forma a célula única chamada de zigoto. Nas angiospermas, entretanto, esse evento é acompanhado pela segunda fecundação, na qual outro gameta une-se aos dois núcleos polares para formar um núcleo triplóide, a partir do qual se desenvolverá o **endosperma** (tecido de nutrição do embrião em desenvolvimento)**.

A embriogênese ocorre no interior do **saco embrionário** do óvulo, enquanto que o óvulo e as estruturas associadas desenvolvem-se em **semente*****. A embriogênese e o desenvolvimento do endosperma ocorrem em paralelo ao desenvolvimento da semente, sendo o embrião parte da semente. O endosperma pode, também, ser parte da semente madura, porém em algumas espécies ele desaparece antes de ser completado o desenvolvimento da semente. A embriogênese e o desenvolvimento da semente são processos altamente ordenados e integrados, ambos iniciados pela dupla fecundação. Quando completados, a semente e o embrião tornam-se dormentes e capazes de sobreviver por longos períodos desfavoráveis de crescimento. A capacidade de formar sementes é uma das chaves para o sucesso evolutivo das angiospermas, assim como das gimnospermas.

O fato de dar origem a um embrião organizado, com uma estrutura previsível e específica, revela-nos que o zigoto é geneticamente programado a se desenvolver de um modo particular, e que a divisão, expansão e diferenciação celulares são rigidamente controladas durante a embriogênese. Se tais processos ocorressem de forma aleatória no embrião, o resultado seria um aglomerado desorganizado de células sem forma ou função definidas.

Nesta seção, serão examinadas essas mudanças em maior detalhe, com enfoque em estudos genéticos moleculares conduzidos com a planta modelo *Arabidopsis*, a qual tem proporcionado a compreensão do desenvolvimento vegetal. É mais provável que a maioria das angiospermas utilize mecanismos semelhantes de desenvolvimento, surgidos no início da evolução das plantas com flor e que a diversidade das formas vegetais foram ocasionadas mais por mudanças relativamente súbitas no momento e no local de expressão dos reguladores moleculares do desenvolvimento do que por mecanismos totalmente diferentes (Doebley e Lukens, 1998).

Arabidopsis thaliana pertence às *Brassicaceae*, família da mostarda (Figura 16.1). Trata-se de uma planta pequena, bem adaptada ao cultivo em laboratório e experimentação. Tem sido chamada a *Drosophila* dos biologistas vegetais, devido ao seu uso generalizado em estudos de genética vegetal e de mecanismos genéticos moleculares, em especial no esforço de compreender as mudanças no desenvolvimento vegetal. Foi a primeira planta superior a ter o genoma completamente seqüenciado. Além disso, há um acordo internacional visando compreender a função de cada gene do genoma de *Arabidopsis* até o ano de 2010. Como resultado, estamos mais próximos de compreender os mecanismos moleculares que governam a embriogênese de *Arabidopsis* do que de qualquer outra espécie vegetal.

A embriogênese estabelece as características essenciais da planta madura

A embriogênese vegetal difere da maioria dos animais por não gerar diretamente os tecidos e órgãos do adulto. A embriogênese das angiospermas, por exemplo, forma um corpo vegetal rudimentar, tipicamente constituído por um eixo embrionário e dois cotilédones (se for uma dicotiledônea). Apesar disso, a embriogênese estabelece os dois padrões básicos de desenvolvimento que persistem e podem ser facilmente identificados na planta adulta:

1. O padrão apical-basal de desenvolvimento axial.
2. O padrão radial de tecidos encontrado nas partes aéreas e raízes.

A embriogênese também estabelece os **meristemas primários**. A maioria das estruturas que constituem a planta adulta é gerada após a embriogênese, por meio da atividade meristemática. Embora esses meristemas primários sejam estabelecidos durante a embriogênese, apenas após a germinação tornam-se ativos e iniciam a formação dos órgãos e dos tecidos do adulto.

---

*N. de T. Apesar de os autores afirmarem que a dupla fecundação é uma característica das angiospermas, trabalhos recentes comprovam que esse evento não é único entre as angiospermas, tendo sido encontrado em exemplares de gimnospermas.

**N. de T. Embora os autores descrevam o segundo processo de fecundação como o de um gameta com dois núcleos polares, em geral, a fusão dá-se entre um gameta e o núcleo secundário (resultado da fusão dos dois núcleos polares), constituindo uma geração acessória denominada xenófito, em correspondência ao esporófito resultante da fusão do gameta com a oosfera (embrião propriamente dito).

***N. de T. Os autores sugerem que o processo da embriogênese ocorre no interior do saco embrionário, porém esse evento transcende os limites do gametófito, atingindo tecidos esporofíticos, como o núcelo e o(s) tegumento(s). Por outro lado, a denominação óvulo, em correspondência à adotada para o reino animal, deveria estar restrita a uma célula única, o que, na realidade, não ocorre, pois o gameta feminino em plantas está cercado de vários tecidos derivados, originados da planta-mãe, constituindo, mais apropriadamente, um rudimento seminal.

(A)

Síliqua (fruto)

Folha (de nó afastado do seguinte)

Entrenó

Folha da roseta

Raízes

(B)

Estame

Carpelo

Pétala

Sépala

(C)

(D)

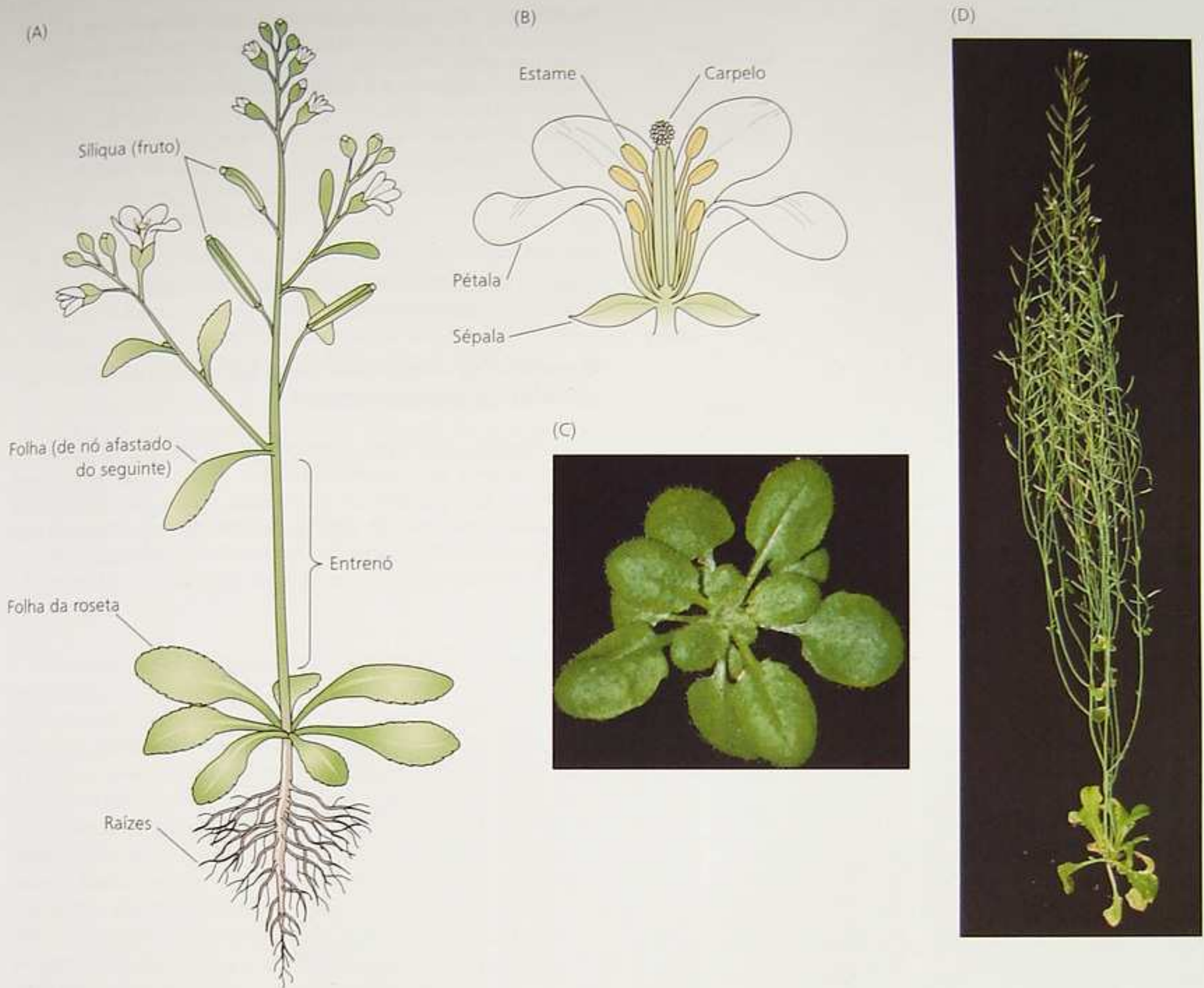



FIGURA 16.1 *Arabidopsis thaliana*. (A) Desenho de uma planta madura, mostrando os vários órgãos. (B) Desenho de uma flor, mostrando os órgãos florais. (C) Uma planta vegetativa imatura, consistindo de folhas dispostas em roseta basal e sistema radicular (não-mostrado). (D) Uma planta madura, após a maioria das flores ter amadurecido e as síliquas terem desenvolvido (A e B segundo Clark, 2001; C e D cedidas por Caren Chang).

Padrão axial. Quase todas as plantas apresentam uma *polaridade axial*, na qual os tecidos e os órgãos são ordenados de forma precisa ao longo de um eixo linear ou polarizado. O meristema apical da parte aérea está em uma das extremidades do eixo, enquanto o apical da raiz está em outra. No embrião e na plântula, um ou dois cotilédones estão ligados logo abaixo do meristema apical da parte aérea. Após, nesse arranjo linear está o hipocótilo, seguido pela raiz, o meristema apical radicular e a coifa. Esse padrão axial é estabelecido durante a embriogênese.

O que parece não ser tão óbvio é o fato de que qualquer segmento individual, tanto da raiz quanto da parte aérea, também ter extremidades apical e basal com propriedades fisiológicas e estruturais distintas. Por exemplo, enquanto raízes adventícias desenvolvem-se da extremidade basal de um caule seccionado, gemas desenvolvem-se da extremidade apical, mesmo se eles estiverem invertidos (ver Figura 19.12).

Padrão radial. Os diferentes tecidos são organizados em um padrão preciso no interior dos órgãos vegetais. Em caules e raízes, os tecidos estão distribuídos em um padrão radial estendendo-se da parte mais externa, do caule ou da raiz, em direção ao seu centro. Se for examinada uma raiz em secção transversal, por exemplo, pode-se ver três anéis concêntricos de tecidos ordenados ao longo do eixo radial: uma camada mais externa de células epidérmicas (a epiderme) recobre um cilindro de tecido cortical (o córtex), o qual, por sua vez, cobre o cilindro vascular (a endoderme, periciclo, floema e xilema) (Figura 16.2) (ver Capítulo 1)*.

A **protoderme** é o meristema que origina a epiderme, o **meristema fundamental** produz o futuro córtex e endoderme, en-

*N. de T. Os autores incluem no cilindro central a endoderme, mas o leitor deve considerar esta camada de células como a mais interna do córtex e pertencente, portanto, ao sistema fundamental. O parágrafo seguinte, dos autores, confirma esta nota.

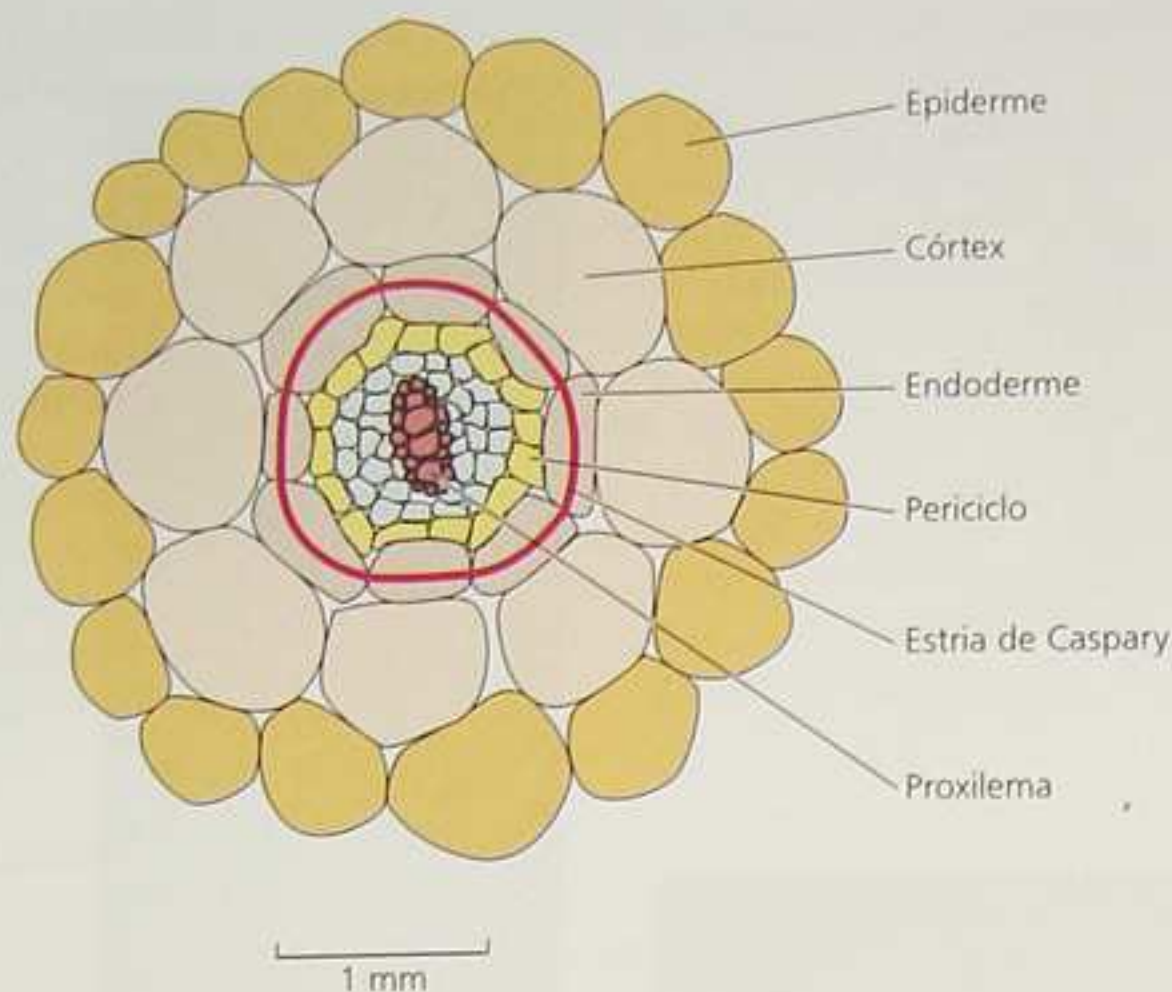



FIGURA 16.2 O padrão radial de tecidos encontrado em órgãos vegetais pode ser observado em uma secção transversal da raiz. Esta secção transversal de uma raiz de *Arabidopsis* foi feita a cerca de 1 mm do ápice, uma região em que os diferentes tecidos estão formados.

quanto o **procâmbio** é o meristema que origina o tecido vascular primário e o câmbio vascular*.

O embrião de *Arabidopsis* passa por quatro estádios distintos de desenvolvimento

O padrão *Arabidopsis* de embriogênese tem sido estudado extensivamente e será apresentado aqui, mas é importante ter em mente que as angiospermas apresentam muitos padrões distintos de desenvolvimento embriogênico, sendo este apenas um dos seus tipos.

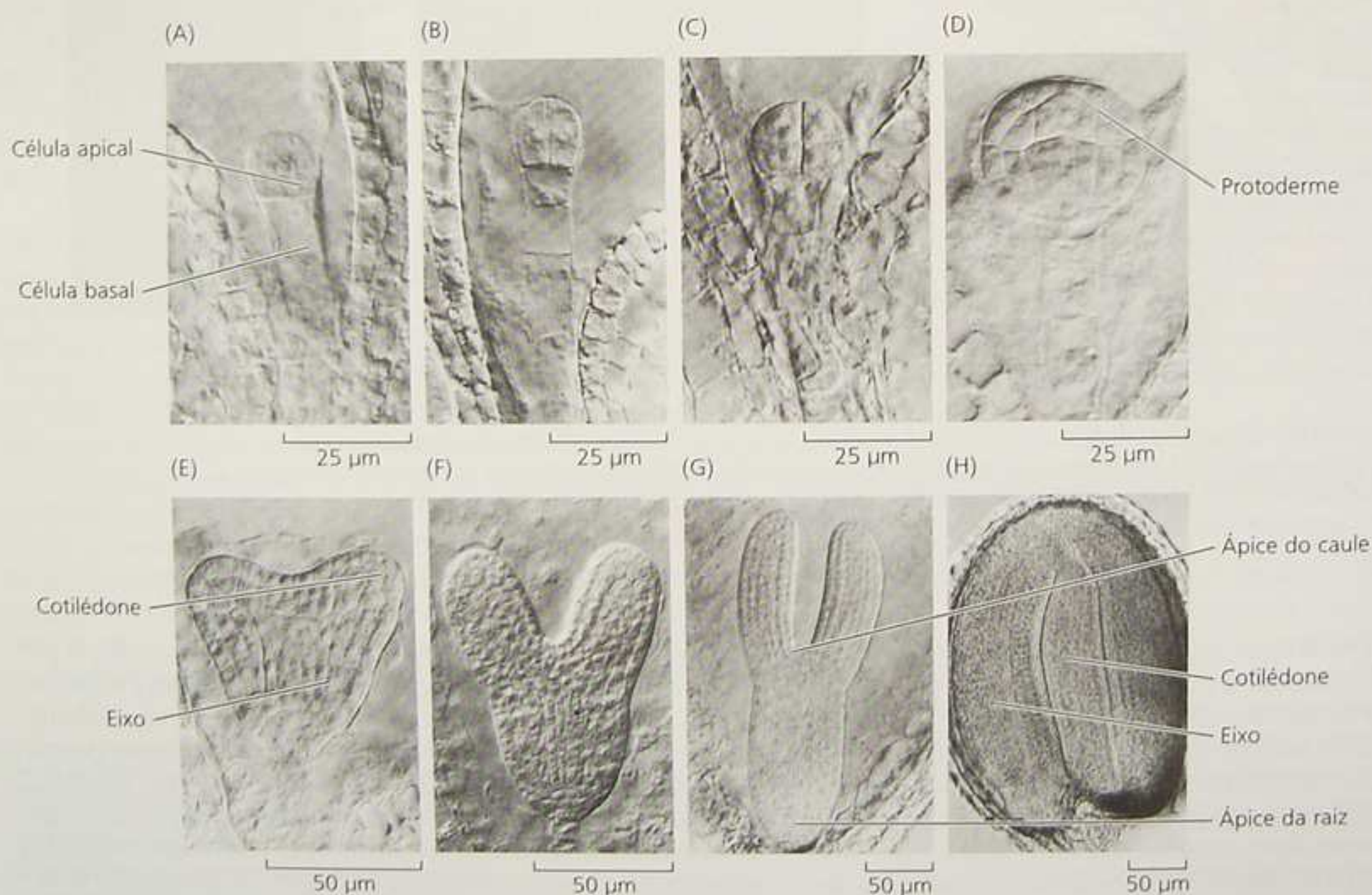



FIGURA 16.3 A embriogênese de *Arabidopsis* é caracterizada por um padrão definido de divisões celulares. Os estádios sucessivos da embriogênese estão aqui representados. (A) Embrião de uma célula após a primeira divisão do zigoto, formando as células apical e basal; (B) embrião de duas células; (C) embrião de oito células; (D) estádio globular inicial, que desenvolveu uma protoderme distinta (camada da superfície); (E) estádio de coração inicial; (F) estádio de coração tardio; (G) estádio de torpedo; (H) embrião maduro (West e Harada, 1993, fotografias de K. Matsudaira Yee; cedidas por John Harada, © American Society of Plant Biologists, impresso com permissão).

*N. de T. Segundo a nomenclatura atual, o meristema pró-vascular origina o sistema vascular primário, sem menção do termo procâmbio.

Os estádios mais importantes da embriogênese em *Arabidopsis* e muitas outras angiospermas, são:

1. O ***estádio globular*** do *embrião*. Após a primeira divisão zigótica, a célula apical experimenta uma série altamente ordenada de divisões, gerando um embrião globular de oito células (**octante**), 30 horas após a fecundação (Figura 16.3C). Divisões celulares, adicionais e precisas, aumentam o número de células na esfera (Figura 16.3D).
2. O ***estádio de coração*** do *embrião*. Esse estádio forma-se por meio de rápidas divisões celulares em duas regiões em cada lado do futuro ápice da parte aérea. Essas duas regiões produzem projeções que mais tarde darão origem aos cotilédones e à simetria bilateral do embrião (Figura 16.3E e F).
3. O ***estádio de torpedo*** do *embrião*. Esse estádio forma-se como resultado do alongamento celular ao longo do eixo do embrião e desenvolvimento posterior dos cotilédones (Figura 16.3G).
4. O ***estádio de maturação*** do *embrião*. Ao final da embriogênese, o embrião e a semente perdem água e tornam-se metabolicamente quiescentes ao entrarem em dormência (Figura 16.3H).

Os cotilédones são órgãos de armazenamento de alimento para muitas espécies e, durante a fase de crescimento do cotilédone, proteínas, amido e lipídeos são sintetizados e depositados nos cotilédones, para serem utilizados pela plântula no crescimento heterotrófico (não-fotossintético) que ocorre após a germinação. Embora as reservas nutritivas sejam armazenadas nos cotilédones de *Arabidopsis*, o crescimento dos cotilédones não é tão expressivo nesta espécie como o é em muitas outras dicotiledôneas. Em monocotiledôneas, as reservas são armazenadas em especial no endosperma. Em *Arabidopsis* e muitas outras dicotiledôneas, o endosperma desenvolve-se rapidamente no início da embriogênese, porém é reabsorvido e o tecido do endosperma não está presente na semente madura.

O padrão axial do embrião é estabelecido durante a primeira divisão celular do zigoto

A polaridade axial é estabelecida em fase muito inicial da embriogênese (ver **Tópico 16.1 na Internet**). De fato, o zigoto torna-se polarizado e se alonga, aproximadamente três vezes seu tamanho original, antes de sofrer sua primeira divisão. A extremidade apical do zigoto possui um citoplasma denso, enquanto que a metade basal da célula contém um grande vacúolo central (Figura 16.4).

A primeira divisão do zigoto é assimétrica e ocorre em ângulo reto ao eixo longitudinal. Essa divisão origina duas células — uma apical e outra basal — cujos destinos são muito diferentes (ver Figura 16.3A). A menor, a célula filha apical, recebe mais citoplasma do que a maior, a célula basal, a qual herda o grande vacúolo zigótico. Quase todas as estruturas do embrião, e ao final da planta madura, são derivadas da célula apical menor. Duas divisões verticais e uma horizontal da célula apical originam o embrião globular de oito células (octante) (ver Figura 16.3C).

A célula basal também se divide, porém todas as suas divisões são horizontais, em ângulo reto ao eixo longitudinal. O resultado é um filamento composto por seis a nove células conhecidas como **suspensor**, o qual conecta o embrião ao sistema vascular da planta*. Apenas uma das derivadas da célula basal contribui para a formação do embrião. A derivada da célula basal mais próxima do embrião é conhecida como **hipófise** e forma a **columela**, ou parte central da coifa, e uma parte essencial do meristema apical da raiz conhecida como *centro quiescente*, o qual será discutido mais tarde neste capítulo (Figura 16.5).

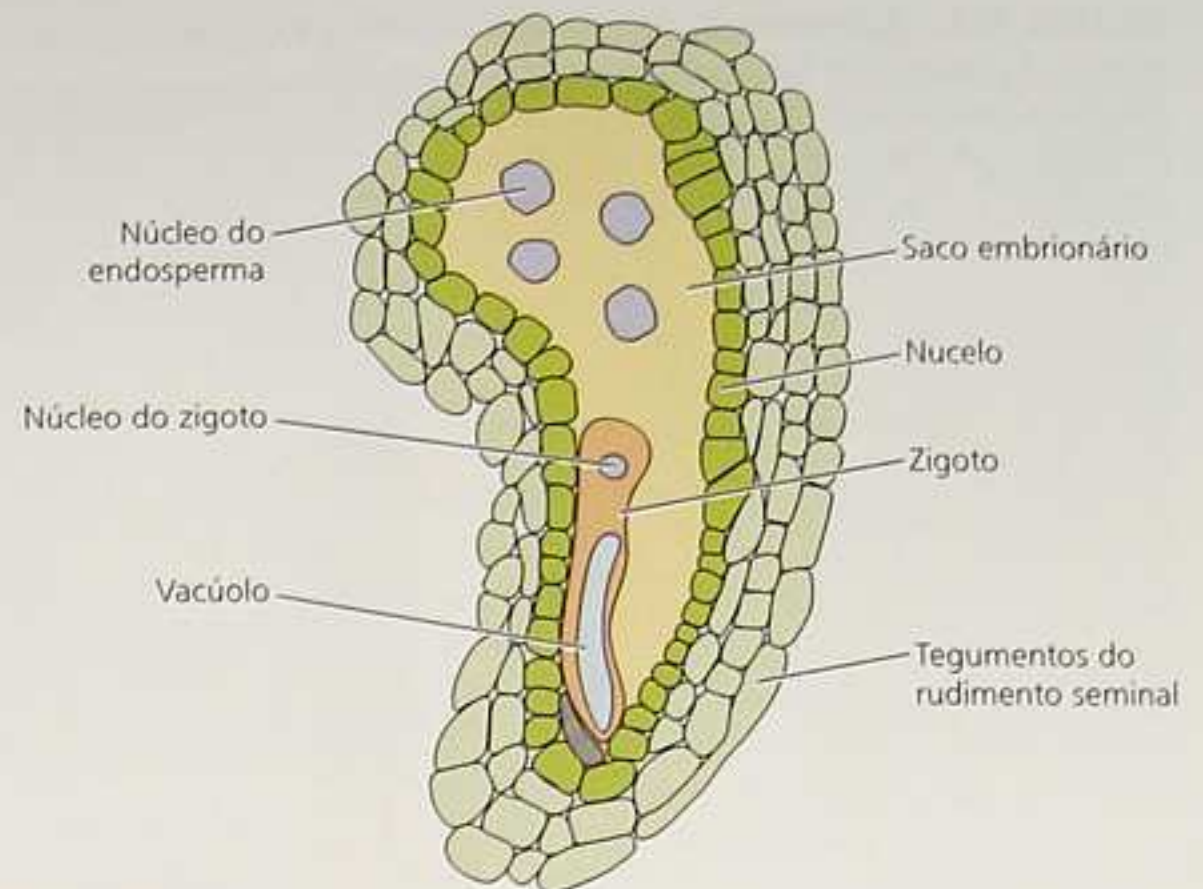



FIGURA 16.4 O rudimento seminal de *Arabidopsis* contendo o saco embrionário a cerca de quatro horas após a dupla fecundação. O zigoto exibe uma marcada polarização. A metade terminal do zigoto possui citoplasma denso e um único núcleo grande, enquanto um vacúolo central grande ocupa a metade basal da célula. Neste estádio, o saco embrionário, circundando o zigoto, contém quatro núcleos no endosperma.

Apesar de o embrião ser esférico ao longo de todo o estádio globular da embriogênese (ver Figura 16.3A-D), as células do interior das metades apical e basal da esfera têm identidades e funções diferentes. Como o embrião continua a crescer e alcança o estádio de coração, sua polaridade axial torna-se muito distinta (ver Figura 16.5), sendo possível reconhecer prontamente três regiões axiais:

1. A *região apical* que dá origem aos cotilédones e ao meristema apical da parte aérea.
2. A *região mediana* que dá origem ao hipocótilo, à raiz e à maior parte do meristema da raiz.
3. A *hipófise* que dá origem ao restante do meristema da raiz.

As células dos setores superior e inferior do embrião em estádio globular inicial diferem e o embrião é dividido em uma metade apical e em outra basal, refletindo o padrão axial imposto ao embrião, no zigoto.

O padrão radial de diferenciação dos tecidos é primeiramente visível no estádio globular

O padrão radial de diferenciação dos tecidos é primeiramente observado no embrião octante** (Figura 16.6). Como as divisões

*N. de T. O suspensor e a célula basal estão voltados para a micrópila, portanto, muito afastados de qualquer suprimento vascular do rudimento seminal localizado na calaza.

**N. de T. Na verdade, no original, os autores utilizam esta forma, porém se referem ao embrião globular.

FIGURA 16.5 A organização apical-basal de tecidos e órgãos vegetais é estabelecida bem cedo na embriogênese. Este diagrama ilustra como os órgãos da plântula inicial de *Arabidopsis* originam-se de regiões específicas do embrião (Willemsen e cols., 1998).

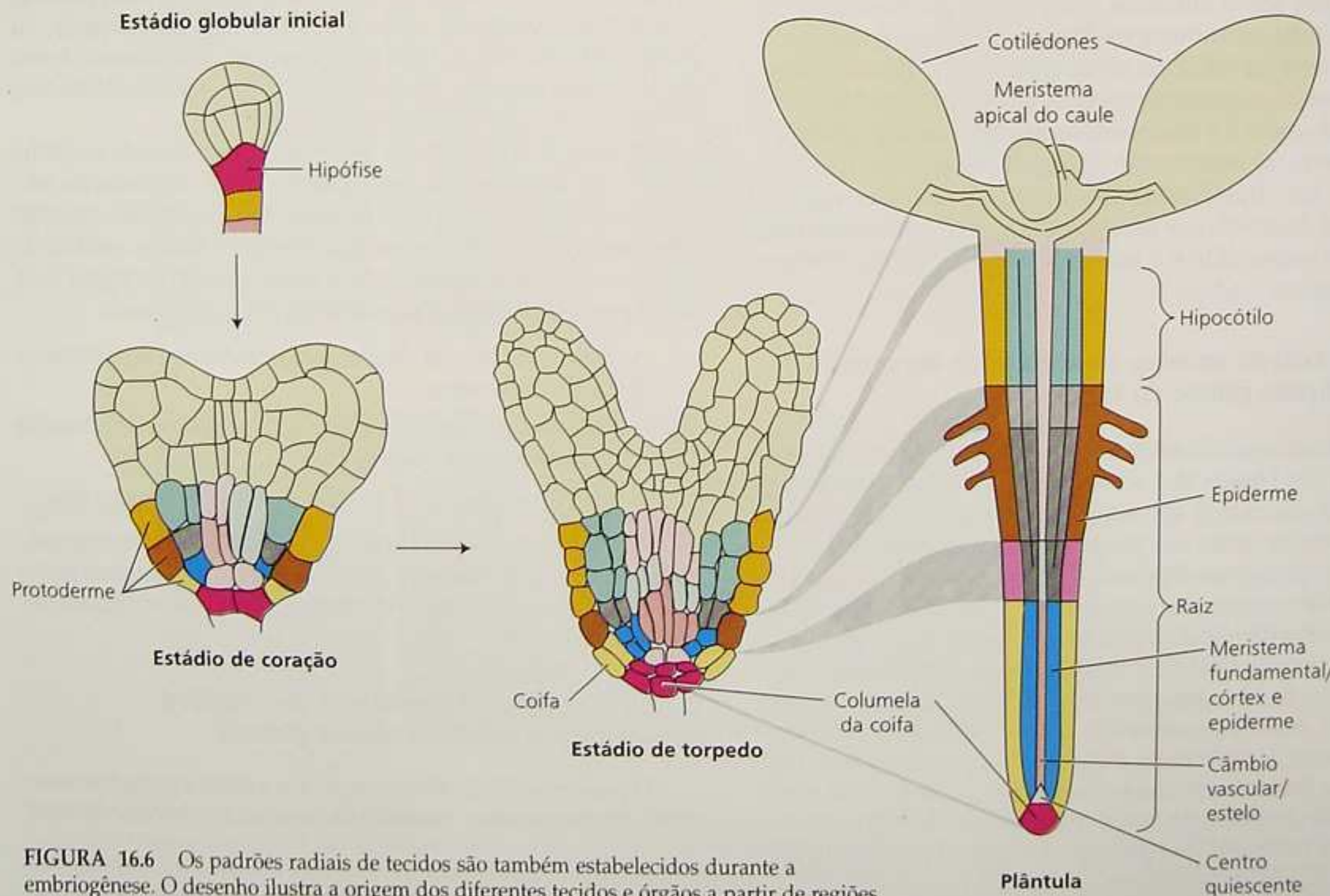
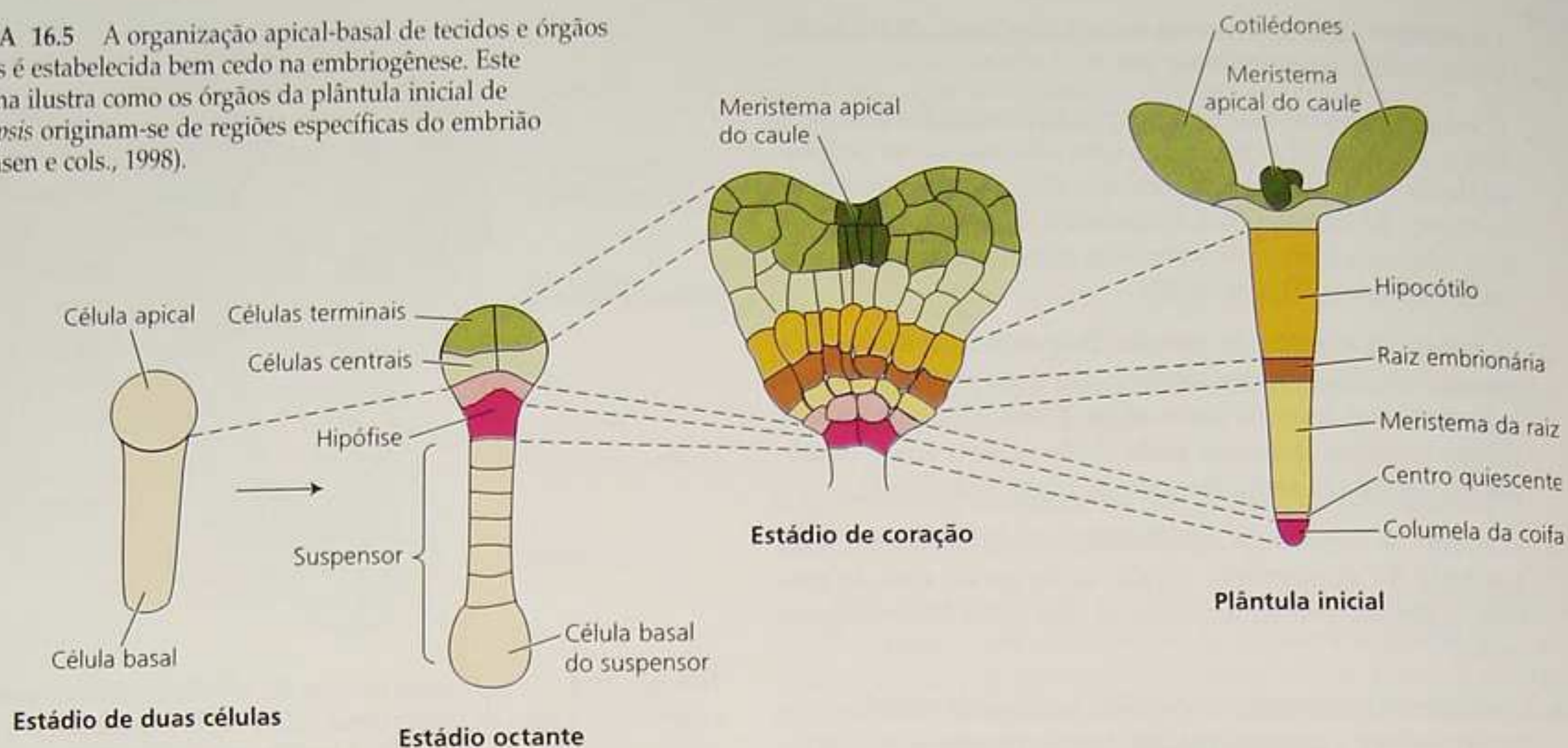



FIGURA 16.6 Os padrões radiais de tecidos são também estabelecidos durante a embriogênese. O desenho ilustra a origem dos diferentes tecidos e órgãos a partir de regiões embrionárias, na embriogênese de *Arabidopsis*. As linhas cinza entre os estádios de torpedo e de plântula indicam as regiões do embrião que originam as várias regiões da plântula. As regiões expandidas representam limites onde o destino do desenvolvimento é um tanto flexível (Van Den Berg e cols., 1993).

celulares continuam no embrião globular, divisões transversais dividem, radialmente, o grupo inferior de células, em três regiões, as quais se tornarão os tecidos radialmente orientados do eixo da raiz e do caule. As células mais externas formam uma camada superficial de uma célula de espessura, conhecida como **protoderme**, que cobre ambas as metades do embrião e origina a epiderme.

As células que se tornam o meristema fundamental estão abaixo da protoderme. O meristema fundamental origina o **córtex** e, na raiz e no hipocótilo, também produzem a **endoderme.** O procâmbio é o núcleo interno de células alongadas que originam os **tecidos vasculares** e, na raiz, o **periciclo** (ver Figura 16.2).

A embriogênese requer expressão gênica específica

A análise de mutantes de *Arabidopsis*, com falhas no estabelecimento da polaridade axial ou com desenvolvimento anormal durante a embriogênese, possibilitou a identificação de genes cuja expressão determinava o padrão de tecidos durante a embriogênese.

O gene GNOM: padrão axial. As plântulas homozigotas para a mutação no gene *GNOM* perdem as raízes e os cotilédones (Figura 16.7A) (Mayer e cols., 1993). Os defeitos em embriões *gnom* aparecem primeiro durante a divisão inicial do zigoto, persistindo ao longo da embriogênese. Em mutantes mais extremos, os embriões *gnom* são esféricos e perdem totalmente a polaridade axial. Pode-se concluir que a expressão do gene *GNOM* é necessária para o estabelecimento da polaridade axial[1].

O gene MONOPTEROS: raiz primária e tecido vascular. As mutações no gene *MONOPTEROS (MP)* resultam em plântulas com ausência de hipocótilo e raiz, embora produzam uma região apical. As estruturas apicais em embriões *mp* mutantes não são estruturalmente normais e os tecidos dos cotilédones são desorganizados (Figura 16.7B) (Berleth e Jürgens, 1993). Os embriões *mp* mutantes inicialmente demonstram anormalidades no estádio octante e não formam procâmbio na parte inferior do embrião globular, porção que daria origem ao hipocótilo e à raiz. Posteriormente, algum tecido vascular forma-se nos cotilédones, porém os feixes são inapropriadamente conectados.

Embora em embriões *mp* mutantes falte uma raiz primária quando germinam, eles formam raízes adventícias em plântulas que crescem até planta adulta. Os tecidos vasculares em todos os órgãos dessas plantas mutantes são fracamente desenvolvidos e com freqüentes descontinuidades. Assim, o gene *MP* é necessário para a formação da raiz primária embrionária, porém não para a formação de raiz na planta adulta. O gene *MP* é importante para a formação do tecido vascular no desenvolvimento pós-embrionário (Przemeck e cols., 1996).

(A) Tipo selvagem mutante *gnom* (B) Tipo selvagem mutante *monopteros*

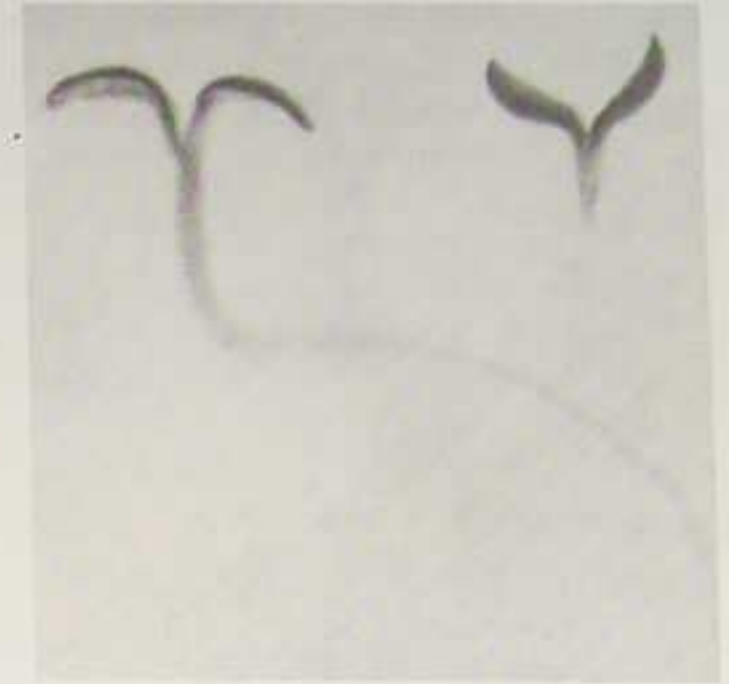
Genes *GNOM* controlam a polaridade apical-basal

Genes *MONOPTEROS* controlam a formação da raiz primária

FIGURA 16.7 Genes, cujas funções são essenciais para a embriogênese de *Arabidopsis*, foram identificados pela seleção de mutantes, tais como *gnom* e *monopteros*, nos quais um estádio da embriogênese é bloqueado. O desenvolvimento de plântulas de mutantes é comparado aqui com o do tipo selvagem no mesmo estádio de desenvolvimento. (A) O gene *GNOM* ajuda a estabelecer a polaridade apical-basal. Uma planta homozigota para *gnom* é mostrada à direita. (B) O gene *MONOPTEROS* é necessário para o padrão basal e a formação da raiz primária. As plantas homozigotas para a mutação *monopteros* têm um hipocótilo, um meristema apical do caule normal e cotilédones, mas não possuem raiz primária (A de Willemsen e cols., 1998; B de Berleth e Jürgens, 1993).

Os genes SHORT ROOT *e* SCARECROW: *desenvolvimento do tecido fundamental.* Foram identificados genes que atuam no estabelecimento do padrão de tecido radial na raiz e no hipocótilo durante a embriogênese. Tais genes também são necessários para a manutenção do padrão radial durante o desenvolvimento pós-embrionário (Scheres e cols., 1995; Di Laurenzio e cols., 1996). Para identificar esses genes, os pesquisadores isolaram mutantes de *Arabidopsis* que causam o crescimento lento de raízes (Figura 16.8B). As análises desses mutantes identificaram vários com falhas no padrão de tecido radial. Dois dos genes afetados, *SHORT ROOT (SHR)* e *SCARECROW (SCR)*, são necessários para a diferenciação do tecido e para a diferenciação celular, não apenas no embrião, mas também em raízes primárias e secundárias e no hipocótilo.

Os mutantes *SHR* e *SCR* produzem raízes com uma única camada de tecido fundamental (Figura 16.8D). As células pertencentes a essa única camada de tecido fundamental têm uma identidade mista e demonstram características tanto de células endodérmicas quanto de células corticais em plantas com a mutação *scr*. Essas plantas *scr* mutantes também perdem a camada de células denominadas **bainha amilífera,** uma estrutura envolvida na resposta do crescimento à gravidade (ver Capítulo 19). As raízes de plantas com a mutação *shr* também têm uma única camada de tecido fundamental, porém esta tem características de células corticais e ausência de características endodérmicas.

O gene *HOBBIT*: o meristema da raiz. Os meristemas da raiz primária e da parte aérea são estabelecidos durante a embriogênese. Pelo fato de os mesmos não serem ativos neste momento, o termo *promeristema* pode ser mais apropriado para descrever tais estruturas. Um **promeristema** pode ser definido como uma estru-

[1] Em discussões de geneticistas vegetais e de leveduras, genes do tipo selvagem (normal) são expressos em letras maiúsculas e itálico (neste caso *GNOM*) e as mutações são expressas em letras minúsculas (aqui *gnom*).

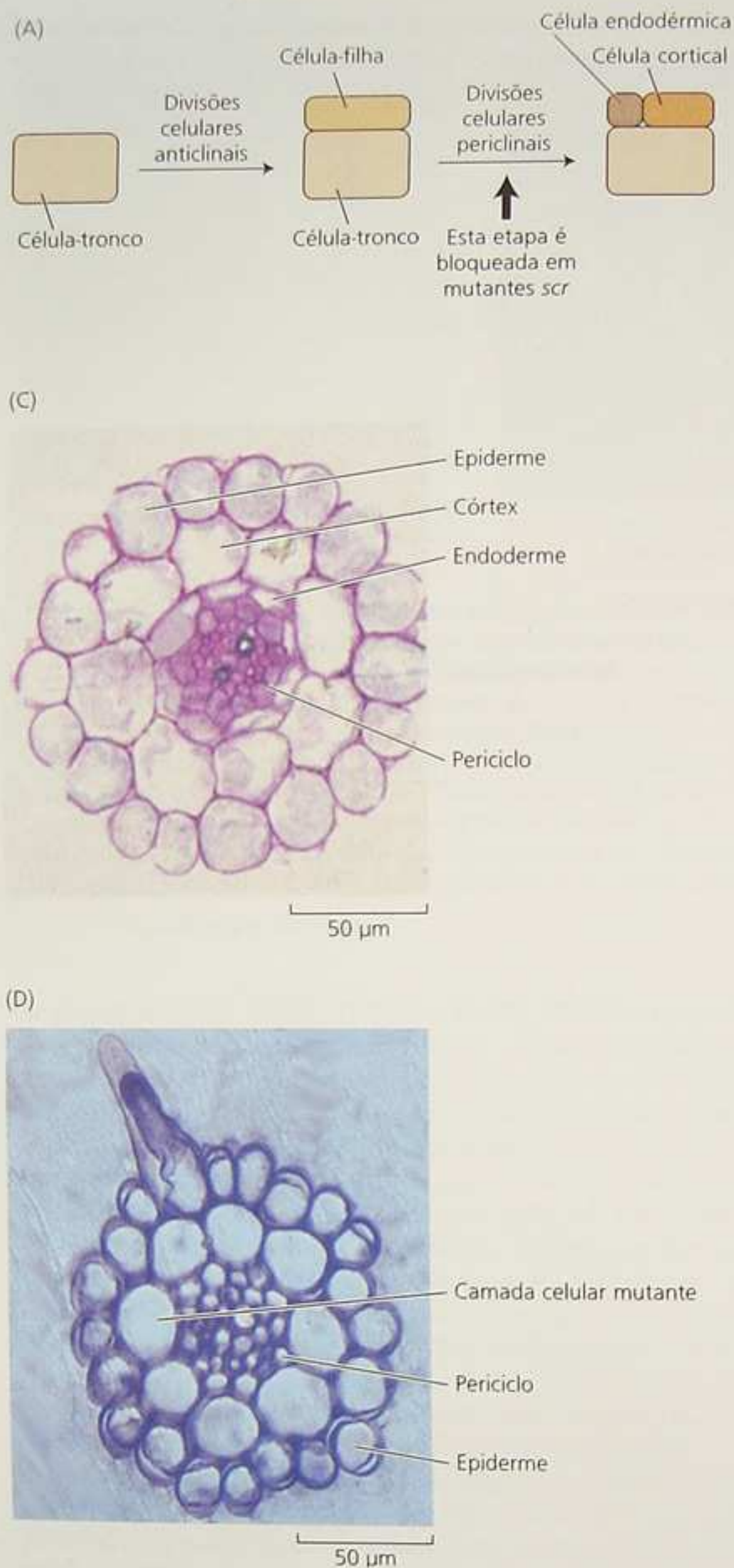



FIGURA 16.8 As mutações no gene *SCARECROW* (*SCR*) de *Arabidopsis* alteram o padrão de tecidos na raiz. (A) Divisões celulares formando a endoderme e o córtex. As células endodérmicas e corticais são derivadas das mesmas células iniciais, como resultado de duas divisões celulares assimétricas. A célula-tronco cortical-endodérmica (célula não-comprometida) expande-se e depois se divide anticlinalmente, se auto-reproduzindo e formando uma célula-filha, a qual, por sua vez, se divide periclinalmente, produzindo uma célula pequena, que desenvolve características endodérmicas, e outra maior, que se torna uma célula cortical. A segunda divisão assimétrica não ocorre em mutantes *scr* e a célula-filha, formada como resultado da divisão anticlinal da inicial, tem características de células corticais e endodérmicas. (B) O crescimento de uma plântula do tipo selvagem de 12 dias de idade (à esquerda) é comparado com o de duas plântulas de 12 dias de idade homozigóticas para uma mutação no gene *SCARECROW* (*SCR*) (no centro e à direita). (C) Secção transversal da raiz primária de uma plântula do tipo selvagem. (D) Secção transversal da raiz primária de uma plântula homozigótica para o mutante *scr* (Di Laurenzio e cols., 1996; fotografias © Cell Press, cedidas por P. Benfey).

tura embrionária que se tornará um meristema após a germinação.

Um marcador molecular para o promeristema da raiz ainda não foi identificado, porém parece ser determinado no início da embriogênese. As células-tronco da coifa (células que se dividem para produzir a coifa) são formadas da hipófise no estádio de coração da embriogênese, indicando que o promeristema da raiz é estabelecido pelo menos nesse estádio (Figura 16.9). A expressão do gene *HOBBIT* pode ser um marcador inicial da identidade do meristema da raiz (Willemsen e cols., 1998).

Os mutantes do gene *HOBBIT* (*HBT*) são defeituosos na formação de uma raiz embrionária funcional, assim como o são plantas *mp* mutantes. Entretanto, essas duas mutações atuam de maneiras muito diferentes. Os mutantes *hbt* começam a apresentar anormalidades no estádio de duas ou quatro células, antes da formação do embrião globular. O defeito primário em mutantes *hbt* é

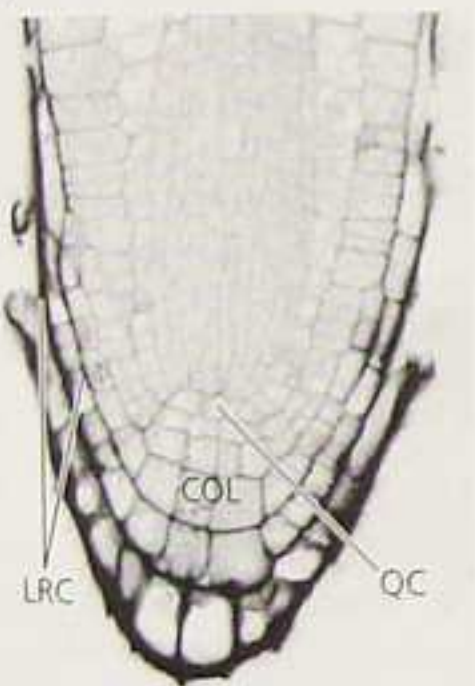



FIGURA 16.9 O gene *HOBBIT* (*HBT*) é importante para o desenvolvimento de um meristema da raiz apical. (A) Tipo selvagem de plântula de *Arabidopsis*; (B) plântula mutante *hobbit*; (C) tipo de raiz de tipo selvagem mostrando o centro quiescente (QC), a columela (COL) e a coifa lateral (LRC); (D) tipo de raiz *hobbit* mutante; (E) centro quiescente e columela de tipo selvagem; (F) ausência do centro quiescente e da columela *hobbit*. As plântulas em A e B são mostradas 7 dias após germinação (ampliação 4x). A coloração com iodo revela sementes nas células da columela da coifa no tipo selvagem (E). Sementes não estão presentes no tipo *hbt* mutante (F) (segundo Willemsen e cols., 1998).

na precursora hipofisal, que se divide verticalmente em vez de se dividir horizontalmente. Como resultado, a hipófise não se forma e o meristema da raiz, formado subseqüentemente, perde o centro quiescente e a columela (ver Figura 16.9F). Embriões de mutantes *hbt* parecem possuir um meristema radicular, porém não entra em funcionamento quando a plântula germina. Além disso, plantas desenvolvidas de embriões *hbt* mutantes são incapazes de formar raízes laterais.

O gene SHOOTMERISTEMLESS: *o promeristema da parte aérea.* O promeristema da parte aérea pode ser reconhecido morfologicamente no estádio de torpedo da embriogênese de *Arabidopsis*. Divisões celulares orientadas de algumas das células entre os cotilédones resultam no surgimento de uma protuberância na região, característica do meristema apical da parte aérea (como descrita mais adiante neste capítulo). Entretanto, os progenitores dessas células provavelmente adquirem a identidade molecular das células do meristema apical da parte aérea muito antes, durante o estádio globular.

O gene *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) é expresso especificamente em células que se tornarão o meristema apical da parte aérea, sendo necessária sua expressão nessas células para a formação do promeristema da parte aérea. Plantas de *Arabidopsis*, homozigotas para o mutante perda-da-função do gene STM, não formam um meristema apical da parte aérea e, em vez disso, todas as células nessa região são diferenciadas (Lincoln e cols., 1994). O produto do gene tipo selvagem *STM* parece suprimir a diferenciação celular, garantindo que as células meristemáticas permaneçam indiferenciadas.

O mRNA do *STM* pode ser detectado em uma ou duas células da extremidade apical do embrião globular. No estádio de coração, a expressão do *STM* é confinada a poucas células entre os cotilédones (Long e cols., 1996). Como o *STM* atua na forma de um marcador para essas células, o meristema apical da parte aérea é determinado muito antes de poder ser reconhecido morfologicamente. O gene *STM* é necessário não apenas para a formação do meristema apical embrionário da parte aérea, mas também para a manutenção da identidade do meristema apical da parte aérea na planta adulta. O papel dos núcleos no controle do desenvolvimento foi primeiramente demonstrado na alga gigante unicelular, *Acetabularia* (ver **Ensaio 16.2 na Internet**).

A maturação do embrião requer expressão gênica específica

O embrião de *Arabidopsis* entra em dormência após ter gerado, aproximadamente, 20.000 células. A dormência ocorre por perda de água e interrupção geral da transcrição gênica e síntese de proteínas, não apenas no embrião, mas também em toda a semente. Para adaptar a célula a condição especial de dormência, é necessária uma expressão gênica específica. Por exemplo, os genes *ABSCISIC ACID INSENSITIVE3* (*ABI3*) e *FUSCA3* são necessários para a inibição da dormência e sensíveis ao hormônio ácido abscísico, o qual é uma molécula sinalizadora que inicia a dormência da semente e do embrião. O *ABI3* também controla a expressão dos genes que codificam o armazenamento de proteínas depositadas nos cotilédones durante a fase de maturação da embriogênese (ver Capítulo 23).

O gene *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*) também é ativo na embriogênese final. Como os mutantes *lec1* não conseguem sobreviver à dessecação e não entram em dormência, os embriões morrem, a menos que sejam salvos por meio de isolamento, antes de ocorrer o dessecamento. Os embriões salvos germinam em cultura e produzem plantas férteis semelhantes ao tipo selvagem, exceto pela falta de proteínas de armazenamento 7S e pela presença de cotilédones foliosos com tricomas na sua superfície superior.

A aparência e o desenvolvimento normais dos mutantes *lec1* maduros indicam que o gene *LEC1* é necessário apenas durante a embriogênese. Embora as falhas mais óbvias dos mutantes *lec1* sejam perceptíveis apenas na fase de maturação do embrião, o mRNA da expressão do gene *LEC1* pode ser detectado ao longo da embriogênese. Foi proposto que o *LEC1* seja o repressor geral do desenvolvimento vegetativo e que sua expressão é necessária ao longo da embriogênese (Lotan e cols., 1998).

O PAPEL DA CITOCINESE NA FORMAÇÃO DE PADRÕES

Uma das características mais surpreendentes da organização dos tecidos em muitas plantas, ilustrado por *Arabidopsis*, é o padrão marcadamente preciso da orientação das divisões celulares, muitas vezes denominada *padronizada*. Esse padrão de divisões origina fileiras de células que se estendem desde o meristema até a base da planta. Embora o padrão de divisão não seja tão preciso em todas as outras espécies, o padrão básico de formação de tecido é similar. Quão importante é o plano de divisão celular para o estabelecimento dos padrões de tecido encontrado nos órgãos vegetais?

A divisão celular padronizada não é necessária para os padrões axial e radial de diferenciação do tecido

Dois mutantes de *Arabidopsis*, *fass* e *ton*, têm efeitos drásticos sobre os padrões de divisão celular em todos os estádios de desenvolvimento e descartam as divisões padronizadas ocorrentes no

Arabidopsis do tipo selvagem
(A) (B) (C)
50 µm
Mutante *ton* homozigoto
(D) (E) (F)
60 µm

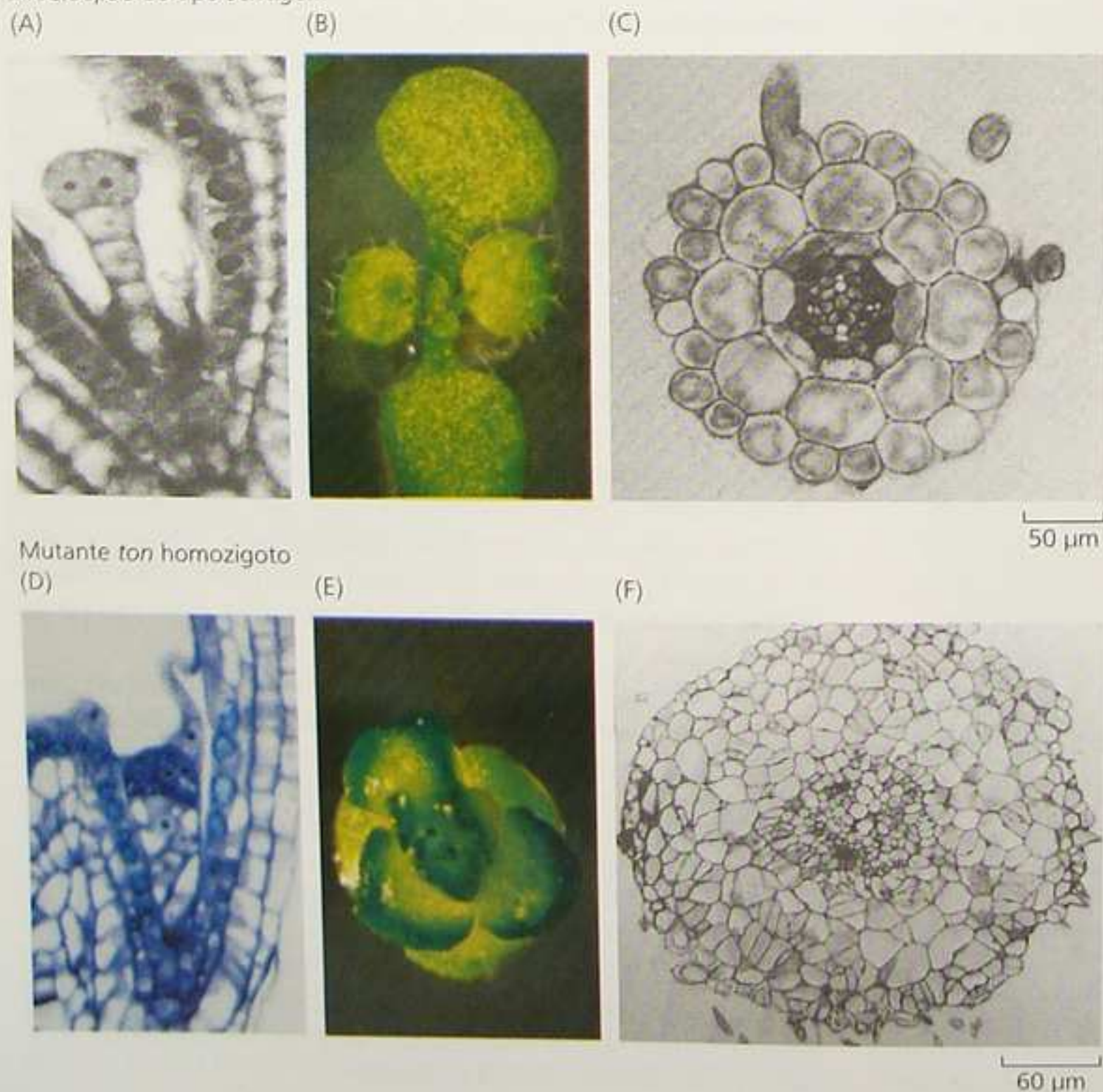



FIGURA 16.10 Plantas de *Arabidopsis* com mutações no gene *TON* são incapazes de formar uma faixa pré-prófase de microtúbulos em células em qualquer estádio de divisão. As plântulas portadoras desta mutação são altamente irregulares quanto à divisão celular e aos planos de expansão e, como resultado, elas são severamente deformadas. Contudo, continuam a produzir tecidos e órgãos reconhecíveis em suas posições corretas. Apesar dos órgãos e os tecidos produzidos por estas plantas mutantes serem altamente anormais, o padrão radial de tecido não sofre distúrbio. (A-C) Tipo selvagem de *Arabidopsis*: (A) estádio globular inicial do embrião; (B) plântula vista a partir do topo; (C) seção transversal de uma raiz. (D-F) Estádios comparáveis de *Arabidopsis* homozigotas para a mutanção *ton*: (D) embriogênese inicial; (E) plântula mutante vista a partir do topo; (F) seção transversal da raiz mutante, mostrando a orientação aleatória das células, mas uma ordem de tecidos próximo ao tipo selvagem; uma camada epidérmica externa cobre um córtex multicelular, que, por sua vez, circunda o cilindro vascular (Traas e cols., 1995).

tipo selvagem (Torres-Ruiz e Jürgens, 1994; Traas e cols., 1995). Tais mutações provavelmente ocorrem no mesmo gene, e células em plantas homozigotas para a mutação *ton* (*fass*) perdem uma estrutura citoplasmática conhecida como *faixa pré-prófase* de microtúbulos. A faixa pré-prófase parece ser essencial para a orientação do fragmoplasto durante a citocinese e, assim, necessária à orientação das divisões celulares (ver **Capítulo 1** e **Tópico 16.2 na Internet**).

Os efeitos da mutação *ton* (*fass*) são vistos desde os estádios iniciais da embriogênese e persistem ao longo do desenvolvimento. As plantas são pequeníssimas, nunca alcançando mais de 2 a 3 cm de altura, têm folhas, raízes e caules disformes e são estéreis (Figura 16.10D-F). Apesar disso, as plantas mutantes não apenas estabelecem um padrão axial como têm todos os tipos de célula e órgãos do tipo selvagem e ocorrem em suas posições corretas. O número preciso de células encontradas em cada camada de tecido difere radicalmente no mutante, porém cada tecido está presente e na ordem exata.

O fato dessas mutações não impedirem o estabelecimento do padrão radial de tecido é uma forte evidência de que o padrão de divisão celular padronizado, encontrado no embrião e na raiz de *Arabidopsis*, não é essencial para o padrão radial de diferenciação de tecido.

Um mutante de *Arabidopsis* com citocinese imperfeita não pode estabelecer o padrão radial de tecido

O mutante *knolle* de *Arabidopsis* apresenta falha na citocinese, a etapa no final da mitose na qual uma nova parede é formada, dividindo os núcleos-filhos em células separadas. O gene *KNOLLE* codifica uma proteína tipo sintaxina, importante para a fusão de vesículas. As **sintaxinas** são proteínas integradas às membranas, permitindo a fusão das mesmas. A fusão de vesículas é essencial para a citocinese (Figura 16.11).

Embora a divisão celular não seja bloqueada pela mutação *knolle*, a formação da placa celular é irregular e, muitas vezes, in-

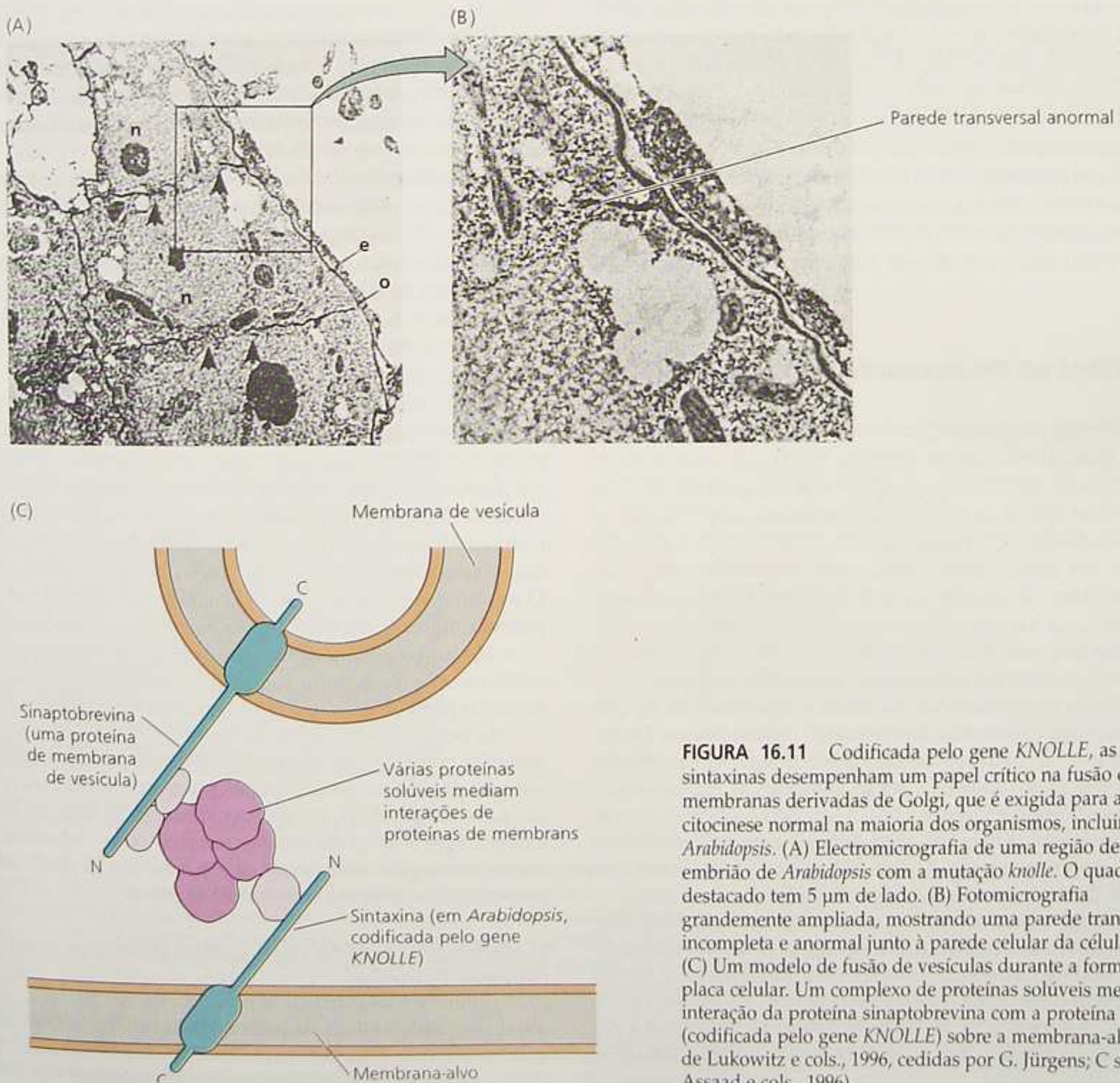



FIGURA 16.11 Codificada pelo gene *KNOLLE*, as proteínas sintaxinas desempenham um papel crítico na fusão de membranas derivadas de Golgi, que é exigida para a citocinese normal na maioria dos organismos, incluindo *Arabidopsis*. (A) Electromicrografia de uma região de um embrião de *Arabidopsis* com a mutação *knolle*. O quadro destacado tem 5 μm de lado. (B) Fotomicrografia grandemente ampliada, mostrando uma parede transversal incompleta e anormal junto à parede celular da célula-mãe. (C) Um modelo de fusão de vesículas durante a formação da placa celular. Um complexo de proteínas solúveis media a interação da proteína sinaptobrevina com a proteína sintaxina (codificada pelo gene *KNOLLE*) sobre a membrana-alvo (A e B de Lukowitz e cols., 1996, cedidas por G. Jürgens; C segundo Assaad e cols., 1996).

completa. Como resultado, muitas células tornam-se binucleadas, enquanto outras são apenas parcialmente separadas ou estão conectadas por grandes pontes citoplasmáticas. Os planos de divisão também são irregulares, com vários efeitos sobre o desenvolvimento.

As plantas homozigotas para a mutação *knolle* concluem a embriogênese: porém, o padrão radial de tecido é severamente desorganizado e a camada epidérmica não se forma na embriogênese inicial. A mutação *knolle* não impede a formação do eixo apical-basal e a embriogênese se completa, embora as plântulas sejam de vida curta, morrendo logo após a germinação. As plantas também perdem os meristemas funcionais.

A conclusão derivada dos estudos da mutação *knolle* parece contradizer o que aprendemos das mutações *ton* (*fass*). Ambas as mutações *knolle* e *ton* desorganizam o padrão normal de divisão celular no desenvolvimento embrionário e pós-embrionário. Porém, enquanto a mutação *knolle* bloqueia o estabelecimento do padrão radial de tecido, no mutante *ton* o padrão é estabelecido.

Uma diferença entre as mutações *ton* e *knolle* é que a última impede a separação efetiva das células-filhas durante a citocinese, pois a placa celular é incompleta. Visto que a comunicação célula-a-célula é importante para a formação do padrão, pode ser necessário o isolamento efetivo das células, de tal forma que a troca de informações possa ser regulada. Ainda quando o citosol é contínuo entre células vegetais adjacentes através de plasmodesmas, a celularização completa é necessária para um desenvolvimento normal. Assim, os mutantes *ton* são capazes de perceber corretamente informação posicional, enquanto os mutantes *knolle* não conseguem. Para uma revisão dos mecanismos que determinam o plano de divisão celular em células vegetais, ver **Ensaio 16.3 na Internet**.

MERISTEMAS NO DESENVOLVIMENTO VEGETAL

Meristemas são populações de células pequenas e isodiamétricas (de igual dimensões em todos os lados) com características embrionárias. Os meristemas vegetativos se autoperpetuam. Eles produzem não apenas os tecidos que formarão o corpo da raiz ou caule, mas também, continuamente, os regeneram. Um meristema pode reter sua característica embrionária indefinidamente, mesmo por milhares de anos no caso de árvores. A razão para esta capacidade é que algumas células meristemáticas não são obrigadas a seguir uma rota de diferenciação, mantendo a capacidade de divisão celular enquanto o meristema se mantém vegetativo.

As células indiferenciadas que retêm a capacidade de divisão celular indefinidamente são denominadas **células-tronco**. Embora historicamente chamadas de *células iniciais* em plantas, funcionalmente são muito similares, senão idênticas, às células-tronco dos animais (Weigel e Jürgens, 2002). Quando as células-tronco se dividem, geralmente uma das células-filhas mantém a identidade da célula-tronco, enquanto a outra é obrigada a seguir uma rota particular de desenvolvimento (Figura 16.12).

As células-tronco em geral se dividem lentamente. Suas células-filhas, entretanto, podem entrar em um período de rápidas divisões celulares antes de interromper as divisões e serem reconhecidas como tipos celulares específicos. As células-tronco representam a fonte final de todas as células no meristema e em todo o resto da planta — raízes, folhas e outros órgãos, assim como caules.

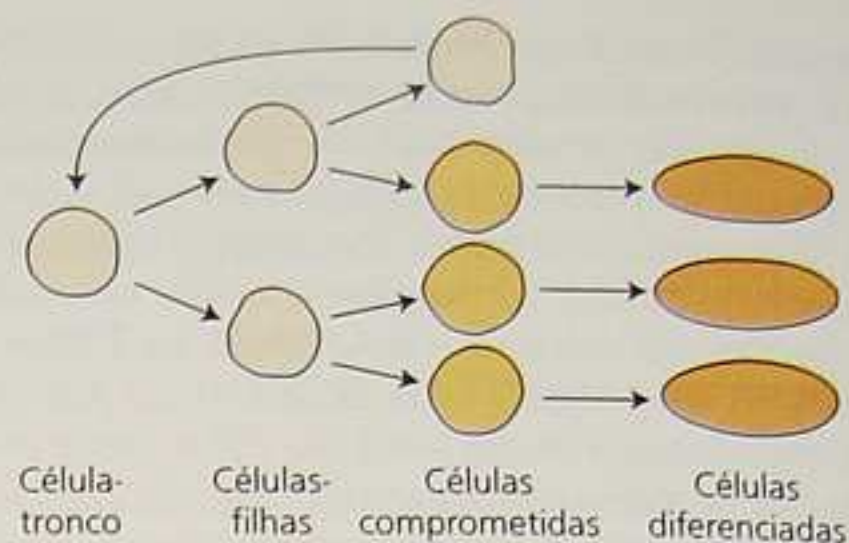



FIGURA 16.12 As células-tronco geram células-filhas, algumas das quais permanecem não comprometidas e retêm a propriedade de células-tronco, enquanto outras se tornam comprometidas para se diferenciarem.

O meristema apical do caule é uma estrutura altamente dinâmica

O meristema apical vegetativo da parte aérea origina o caule assim como os órgãos laterais (folhas e gemas laterais). O meristema apical da parte aérea contém, tipicamente, algumas centenas a milhares de células, embora em *Arabidopsis* este meristema contenha apenas cerca de 60 células.

O meristema apical da parte aérea está localizado na extremidade do eixo, porém rodeado e coberto por folhas imaturas, as quais são produzidas pela atividade do meristema. É recomendável distinguir o ápice da parte aérea do meristema propriamente dito. O **ápice da parte aérea** consiste do meristema apical acrescido dos primórdios foliares formados mais recentemente. O **meristema apical da parte aérea** é apenas a população de células indiferenciadas sem incluir qualquer órgão derivado.

O meristema apical da parte aérea é uma região plana ou levemente elevada, de diâmetro de 100 a 300 mm, composto principalmente por células pequenas, com paredes finas, denso citoplasma e ausência de grandes vacúolos centrais. O meristema apical da parte aérea é uma estrutura dinâmica que muda durante o ciclo de formação de folha e caule. Além disso, em muitas plantas a parte aérea, como um todo, apresenta uma atividade sazonal. O meristema apical da parte aérea pode crescer rapidamente na primavera, entrar em um período de menor crescimento durante o verão e tornar-se dormente no outono e em dormência permanente ao longo do inverno. O tamanho e a estrutura do meristema apical da parte aérea também mudam com a atividade estacional.

As partes aéreas desenvolvem-se e crescem nas suas extremidades, como no caso das raízes, porém as regiões de desenvolvimento não são tão estratificadas e precisamente ordenadas como nas raízes. Além disso, o crescimento ocorre em uma região mais ampla na parte aérea do que no caso das raízes. A qualquer momento uma região com vários internós, com 10 a 15 cm de comprimento, pode apresentar crescimento primário.

O meristema apical do caule contém diferentes zonas e camadas funcionais

O meristema apical da parte aérea consiste de diferentes regiões funcionais que podem ser distinguidas pela orientação dos planos de divisão celular e pelo tamanho e atividade das células.

O meristema apical vegetativo da parte aérea das angiospermas tem, em geral, uma aparência altamente estratificada, composto tipicamente por *três camadas distintas de células*, as quais são designadas como **L1**, **L2** e **L3**, onde L1 é a camada mais externa (do inglês, *layer*) (Figura 16.13). Nas camadas L1 e L2 as divisões celulares são anticlinais; isto é, a nova parede celular que separa as células-filhas está orientada em ângulo reto à superfície do meristema. Na camada L3 as divisões celulares tendem a ser menos regularmente orientadas. Cada camada tem sua própria célula-tronco, e as três camadas contribuem para a formação do caule e dos órgãos laterais.

Os meristemas apicais ativos também têm um padrão organizacional denominado **zonação cito-histológica**. Cada zona está composta por células que podem ser distinguidas não apenas em base nos seus planos de divisão, mas, também, por diferenças de tamanho e grau de vacuolação (ver Figura 16.13B). Essas zonas exibem diferentes padrões de expressão gênica, refletindo as funções distintas de cada zona (Nishimura e cols., 1999; Fletcher e Meyerowitz 2000).

O centro de um meristema em atividade contém um agrupamento de células relativamente grandes e altamente vacuoladas denominado **zona central**, que é algo comparável ao centro quiescente dos meristemas das raízes (mais tarde discutido neste capítulo). Flanqueando a zona central, ocorre uma região de células menores chamada de **zona periférica.** Abaixo das células da zona central, ocorre uma **zona medular** dando origem aos tecidos internos do caule.

Estas três zonas, mais provavelmente, representam diferentes domínios do desenvolvimento. A zona periférica é a região onde as primeiras divisões celulares ocorrem, levando à formação do primórdio foliar. Já a zona medular contribui com células que se tornam o eixo principal, enquanto a zona central contém o conjunto de células-tronco, alguma fração de células que permanecem indiferenciadas, ao passo que outras suprem as populações de células das zonas medular e periférica (Bowman e Eshed, 2000).

Alguns meristemas surgem durante o desenvolvimento pós-embrionário

Os meristemas apicais, da raiz e do caule, formados durante a embriogênese são chamados de **meristemas primários**. Após a germinação, a atividade desses meristemas primários gera os tecidos e órgãos primários, que constituem o corpo primário da planta.

A maioria das plantas também desenvolve uma variedade de **meristemas secundários** durante o desenvolvimento pós-embrionário. Os meristemas secundários podem ter uma estrutura semelhante àquela dos primários, porém alguns meristemas secundários têm uma estrutura totalmente distinta. Neles são incluídos os meristemas axilares, meristemas de inflorescências, meristemas florais, meristemas intercalares e meristemas laterais (o câmbio vascular e o câmbio cortical) (os meristemas de inflorescência e floral serão discutidos no Capítulo 24):

- Os **meristemas axilares** são formados nas axilas de folhas e derivados do meristema apical da parte aérea. O crescimento e o desenvolvimento de meristemas axilares produzem ramificações do eixo principal da planta.
- Os **meristemas intercalares** são encontrados no interior de órgãos, em geral próximos de suas bases. Os meristemas intercalares de folhas e caules de gramíneas permitem continuar seu crescimento apesar do corte e do pastoreio pelo gado.

(A) Primórdios foliares — Meristema apical do caule — L3, com divisões celulares orientadas aleatoriamente — L1 e L2, com divisões celulares anticlinais

(B) Primórdio foliar — Meristema apical do caule — L_1 – Gera epiderme — L_2, L_3 Geram tecidos internos — Zona periférica — Zona central — Zona medular — Zona periférica

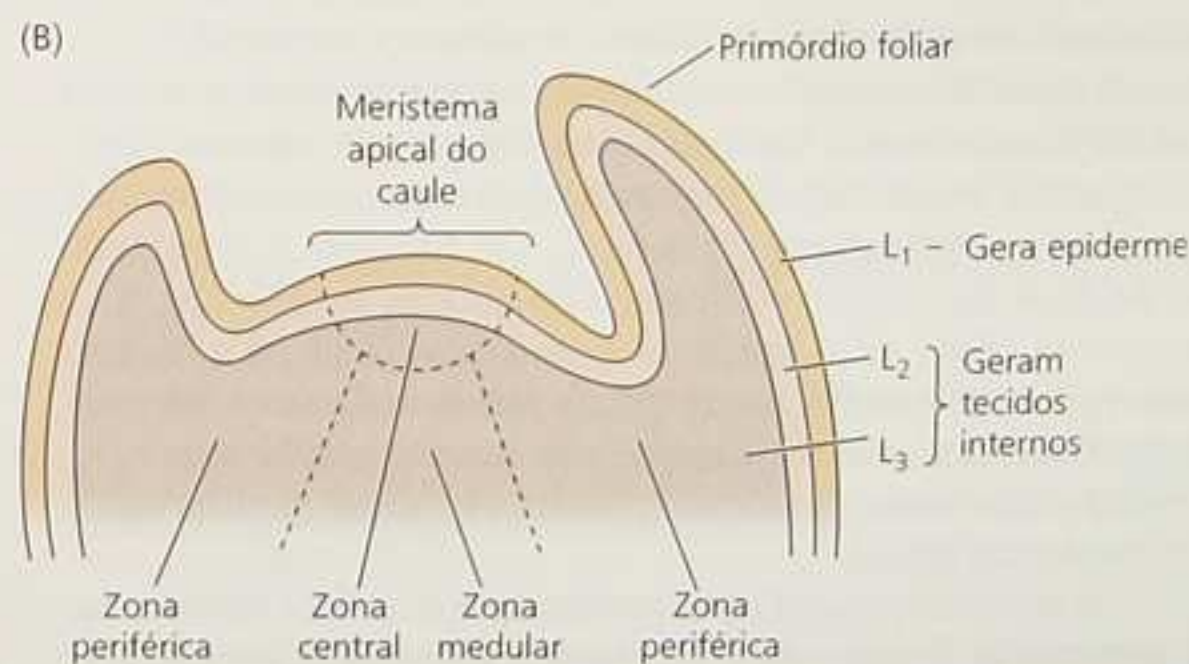
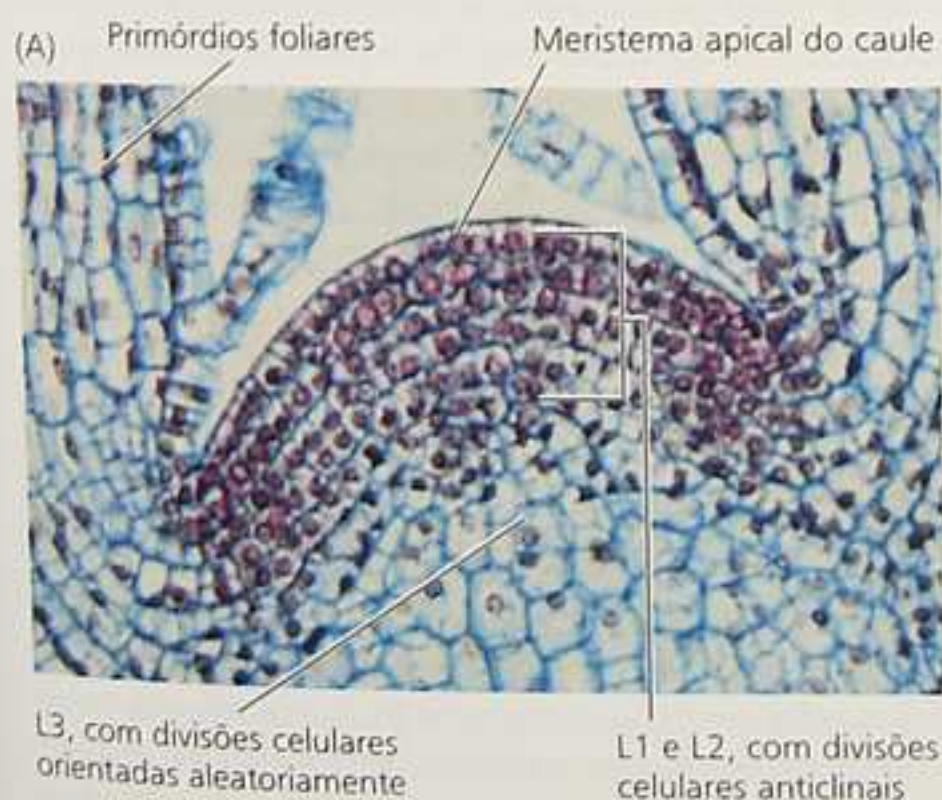



FIGURA 16.13 O meristema apical do caule gera os órgãos aéreos da planta. (A) Esta secção longitudinal pelo centro do ápice do caule de *Coleus blumei* mostra a aparência em camadas do meristema apical do caule. As divisões celulares, na maioria, são anticlinais nas camadas L1 e L2 externas, enquanto os planos de divisões celulares estão orientados mais aleatoriamente na camada L3. A camada mais externa (L1) gera a epiderme do caule; as camadas L2 e L3 geram tecidos internos. (B) O meristema apical do caule também possui zonas cito-histológicas, que representam regiões com identidades e funções diferentes. A zona central contém as células-tronco, que se dividem lentamente, mas são a fonte final dos tecidos que formam o corpo da planta. A zona periférica, onde as células dividem-se rapidamente, circunda a zona central e produz os primórdios foliares. Uma zona medular situa-se abaixo da zona central e gera os tecidos centrais do caule (A © J. N. A. Lott/Biological Photo Service).

- Os **meristemas de raízes laterais** têm a estrutura do meristema da raiz primária, porém são formados a partir de células do periciclo em regiões maduras da raiz. As raízes adventícias também podem ser produzidas a partir de meristemas de raízes laterais que se desenvolvem a partir de caules, bem como quando caules cortados são enraizados para propagar uma planta.
- O **câmbio vascular** é um meristema secundário que se diferencia com o tecido vascular primário a partir do procâmbio do interior do cilindro vascular.* Ele não produz órgãos laterais, apenas tecido lenhoso de caules e raízes. O câmbio vascular contém dois tipos de células meristemáticas: células-tronco fusiformes e células-tronco radiais. As *células-tronco fusiformes* são alongadas, altamente vacuoladas, divididas longitudinalmente para se auto-regenerarem e cujas derivadas se diferenciam em células condutoras do xilema e floema secundários. As *células-tronco radiais* são pequenas células, cujas derivadas incluem as fileiras radialmente orientadas de células de parênquima no interior da madeira, conhecidas como raios.
- O **felogênio** é uma camada meristemática que se desenvolve entre células maduras do córtex e do floema secundário. Derivadas do câmbio da casca diferenciam-se como células suberificadas que formam uma camada protetora denominada *periderme* ou *casca*. A periderme forma a superfície protetora externa do corpo secundário da planta, substituindo a epiderme em caules e raízes lenhosas.

FIGURA 16.14 O meristema apical do caule forma repetitivamente unidades conhecidas como fitômeros. Cada fitômero consiste de uma ou mais folhas, o nó no qual as folhas são inseridas, o entrenó imediatamente abaixo das folhas e uma ou mais gemas nas axilas das folhas.

Meristemas axilar, floral e de inflorescência são variantes do meristema vegetativo

Muitos tipos diferentes de meristemas caulinares podem ser distinguidos em base na sua origem de desenvolvimento, o tipo de órgãos laterais que originam e se são **determinados** (apresentando um limite genético programado ao seu crescimento) ou **indeterminados** (apresentando nenhum limite predeterminado de crescimento; o crescimento continua enquanto permitem os recursos).

O meristema apical vegetativo do caule é indeterminado em seu desenvolvimento. Ele forma, repetitivamente, tantos fitômeros quantos as condições ambientais favoreçam o crescimento, porém não geram estímulos à floração. Um **fitômero** é uma unidade de desenvolvimento consistindo de uma ou mais folhas, o nó ao qual as folhas estão ligadas, o entrenó abaixo do nó e uma ou mais gemas axilares (Figura 16.14). As **gemas axilares** são meristemas secundários; se elas são também meristemas vegetativos, apresentarão estrutura e potencial de desenvolvimento similar àquele do meristema apical.

Os meristemas vegetativos podem ser convertidos diretamente a meristemas florais quando a planta é induzida à floração (ver Capítulo 24). Os **meristemas florais** diferem dos meristemas vegetativos por produzirem, em vez de folhas, órgãos florais: sépalas, pétalas, estames e carpelos. Além disso, os meristemas florais são determinados: toda a atividade meristemática cessa após os últimos órgãos florais serem produzidos.

Em muitos casos, os meristemas vegetativos não se convertem diretamente em meristemas florais. Em vez disso, o meristema vegetativo primeiro se transforma em **meristema de inflorescência.** Os tipos de órgãos laterais produzidos por um meristema de inflorescência são diferentes daqueles produzidos pelo meristema floral. O meristema de inflorescência produz brácteas e meristemas florais na axila das mesmas, em vez de sépalas, pétalas, estames e carpelos produzidos por meristemas florais. Os meristemas de inflorescência podem ser determinados ou indeterminados, dependendo das espécies.

DESENVOLVIMENTO DA FOLHA

Na maioria das plantas, as folhas são órgãos fotossintetizantes, isto é, onde a energia luminosa é capturada e utilizada para coordenar as reações químicas que são vitais para a vida da planta. Embora altamente variável em tamanho e forma de espécie para espécie, as folhas são, em geral, estruturas finas e planas com polaridade dorsiventral, padrão que contrasta com aquele do meristema apical caulinar, com simetria radial. Outra importante diferença é que o primórdio foliar exibe um crescimento determinado, enquanto o meristema apical da parte aérea é indeterminado. Conforme descrito em seções que seguem, muitos estádios distintos podem ser reconhecidos no desenvolvimento foliar (Sinhá, 1999).

Estádio 1: organogênese. Um pequeno número de células das camadas L1 e L2, nos flancos do domo do meristema apical da parte aérea, assume a identidade de **célula fundadora de folha.** Tais células dividem-se mais rapidamente do que as vizinhas e pro-

*N. de T. O procâmbio diferencia o tecido vascular primário, composto por células de parênquima e de condução. Durante a formação do meristema secundário, ocorre uma desdiferenciação de células do parênquima do tecido vascular, e não procambiais.

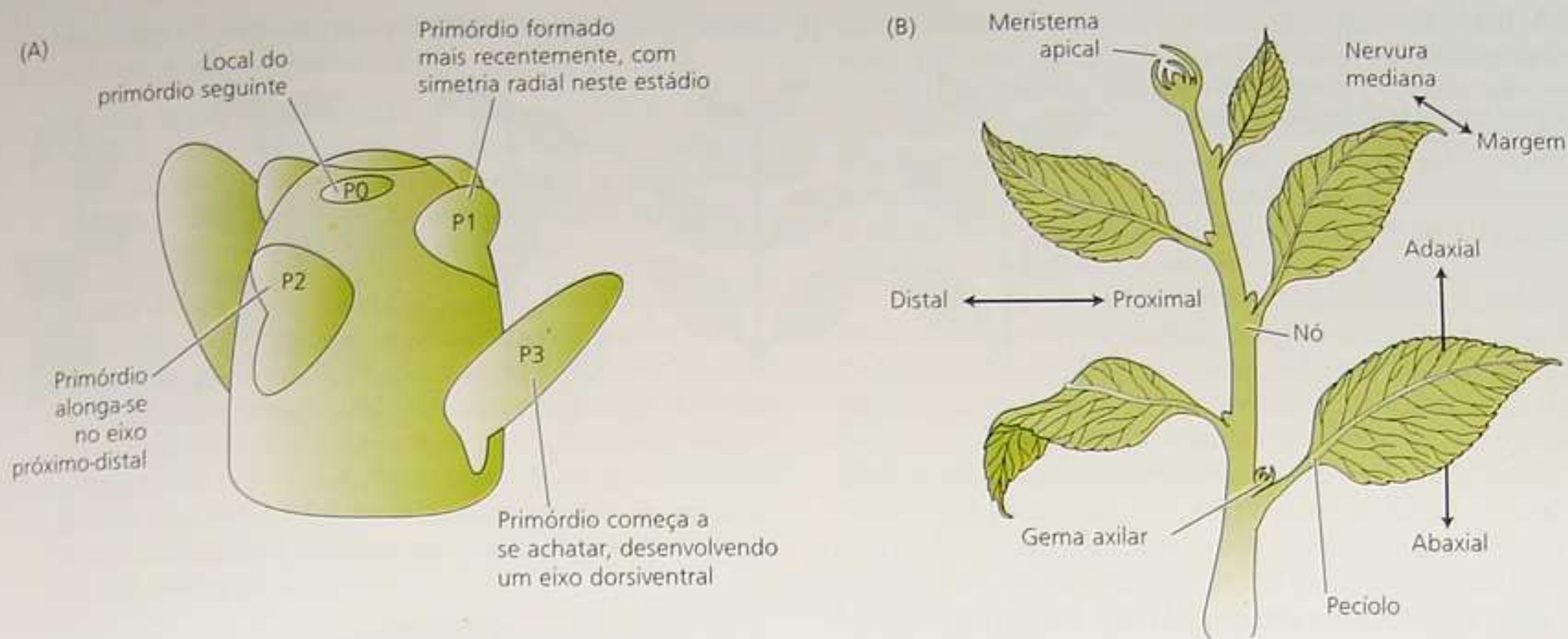



FIGURA 16.15 A origem de folhas no ápice da parte aérea e seus eixos de simetria no caule. (A) Primórdios foliares nos flancos do meristema apical do caule. (B) Diagrama de um caule, mostrando o eixo ao longo do qual se processa o desenvolvimento (Christensen e Weigel, 1998).

duzem uma projeção que representa o **primórdio foliar** (Figura 16.15A). Esses primórdios crescem subseqüentemente e se desenvolvem em folhas.

Estádio 2: desenvolvimento de domínios de subórgão. Regiões distintas do primórdio adquirem identidade como partes específicas da folha. Essa diferenciação ocorre ao longo de três eixos: **dorsi-ventral** (abaxial-adaxial), **proximal-distal** (apical-basal) e **lateral** (margem-lâmina-nervura mediana) (Figura 16.15B). A face superior (adaxial) da folha é especializada para absorção da luz; a superfície inferior (abaxial) para troca gasosa. A estrutura da folha e as taxas de maturação também variam ao longo dos eixos próximo-distal e lateral.

Estádio 3: diferenciação de células e tecidos. Enquanto a folha em desenvolvimento cresce, os tecidos e células se diferenciam. As células derivadas da camada L1 diversificam-se como epiderme (células epidérmicas, tricomas e células-guarda), derivadas da camada L2 diferenciam-se como células fotossintetizantes do mesofilo e os elementos vasculares e as células da bainha vascular são derivadas da camada L3, as quais se diferenciam segundo um padrão geneticamente determinado que é característico da espécie, porém em certo grau modificadas em resposta ao ambiente.

A disposição dos primórdios foliares é geneticamente determinada

A sincronização e o padrão com os quais os primórdios se formam são geneticamente determinados e, em geral, é uma característica da espécie. O número e a ordem nos quais os primórdios se formam se reflete no arranjo subseqüente de folhas ao redor do caule, conhecida como **filotaxia** (Figura 16.16).

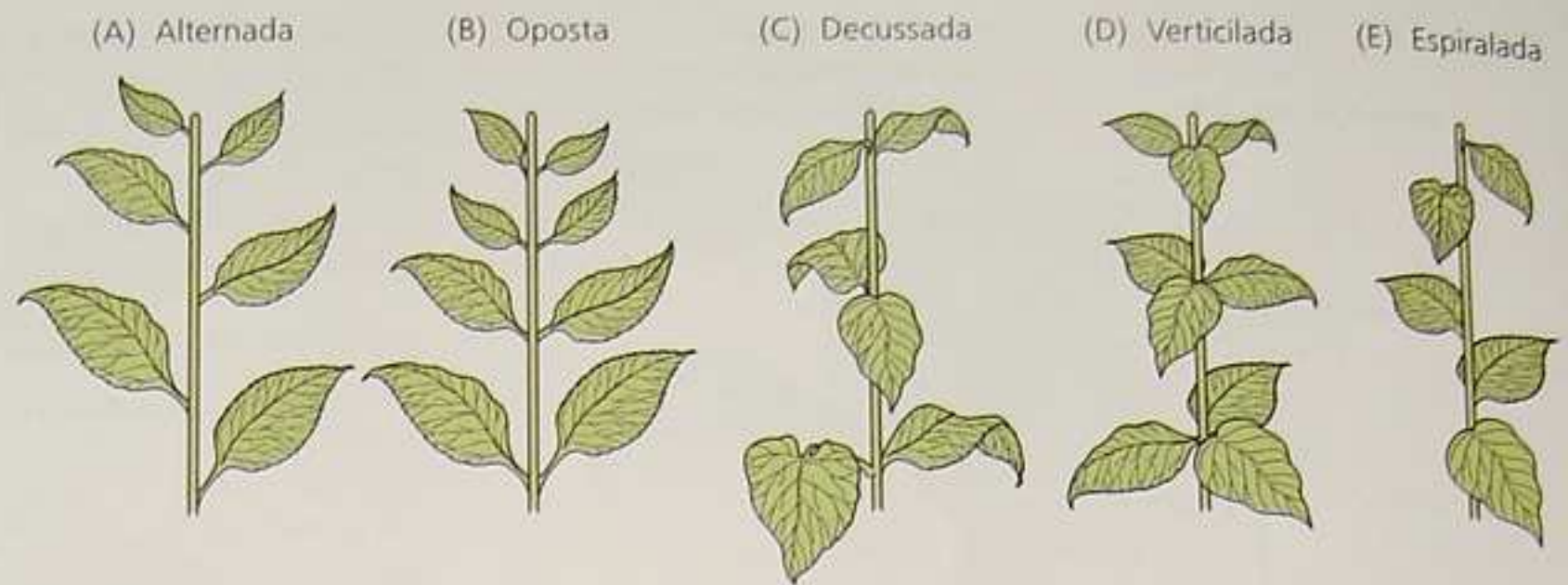
Há cinco tipos principais de filotaxia:

1. *Filotaxia alternada.* Uma única folha é iniciada em cada nó (ver Figura 16.16A).
2. *Filotaxia oposta.* As folhas são formadas aos pares em lados opostos da caule (ver Figura 16.16B).
3. *Filotaxia decussada.* As folhas são iniciadas em um padrão com duas folhas opostas por nó e com pares de folhas sucessivas orientadas, em ângulo reto uma com a outra, durante o desenvolvimento vegetativo (ver Figura 16.16C).
4. *Filotaxia verticilada.* Mais de duas folhas surgem no mesmo nó (ver Figura 16.16D).
5. *Filotaxia espiralada.* Um tipo de filotaxia alternada na qual cada folha é iniciada em ângulo definido com a anterior, resultando um arranjo de folhas em espiral ao redor da haste (ver Figura 16.16E).

O posicionamento do primórdio foliar deve resultar da regulação precisa do crescimento espacial no interior do ápice. Pouco se sabe sobre como esse posicionamento é regulado ou sobre os sinais que iniciam a formação do primórdio. Uma idéia é que campos inibitórios, gerados por primórdios existentes, influenciam o espaçamento do próximo primórdio.

DESENVOLVIMENTO DA RAIZ

As raízes são adaptadas para o crescimento através do solo e para absorção de água e nutrientes minerais nos espaços capilares entre as partículas do solo. Essas funções têm imposto re-

FIGURA 16.16 Cinco tipos de disposições foliares (padrões filotácticos) ao longo do eixo do caule. Os mesmos termos também são usados para inflorescências e flores.

servas sobre a evolução da estrutura da raiz. Por exemplo, apêndices laterais podem interferir com sua penetração através do solo. Como resultado, as raízes têm um eixo aerodinâmico e órgãos laterais não são produzidos pelo meristema apical. As ramificações das raízes surgem internamente e se formam apenas em regiões maduras onde cessaram o crescimento. A absorção de água e de minerais é ampliada por frágeis pêlos radiculares, os quais também se formam atrás da zona de crescimento. Essas células longas aumentam imensamente a área de superfície de absorção da raiz.

Nesta seção, será discutida a origem da forma e estrutura da raiz (*morfogênese da raiz*), iniciando com a descrição de quatro zonas de desenvolvimento da extremidade da raiz. Voltar-se-á, então, ao meristema apical. A ausência de folhas e gemas torna as linhagens de células mais fáceis de serem seguidas nas raízes do que nos caules, assim facilitando estudos genéticos moleculares sobre o papel dos padrões de divisão celular no desenvolvimento da raiz.

A extremidade da raiz tem quatro zonas de desenvolvimento

As raízes crescem e se desenvolvem a partir de sua extremidade distal. Embora os limites não sejam claros, quatro zonas de desenvolvimento podem ser distinguidas na extremidade da raiz: a coifa, a zona meristemática, a de alongamento e a de maturação (Figura 16.17). Estas quatro zonas de desenvolvimento ocupam apenas um pouco mais de 1 mm na extremidade da raiz de *Arabidopsis*. A região de desenvolvimento é maior em outras espécies, porém o crescimento está ainda confinado na extremidade. Com exceção da coifa, os limites dessas zonas se sobrepõem consideravelmente:

- A **coifa** protege o meristema apical da lesão mecânica, visto que as raízes abrem seu caminho pelo solo. Células da coifa formam, por especialização, células-tronco da coifa. Como as células-tronco da coifa produzem novas células, células mais velhas são, progressivamente, deslocadas para a extremidade, onde são, eventualmente, descartadas. Como as células da coifa se diferenciam, podem adquirir a habilidade de perceber o estímulo gravitacional e secretar mucopolissacarídeos que auxiliam na penetração da raiz no solo.
- A **zona meristemática** localiza-se justamente abaixo da coifa e em *Arabidopsis* tem um quarto de milímetro de extensão. O

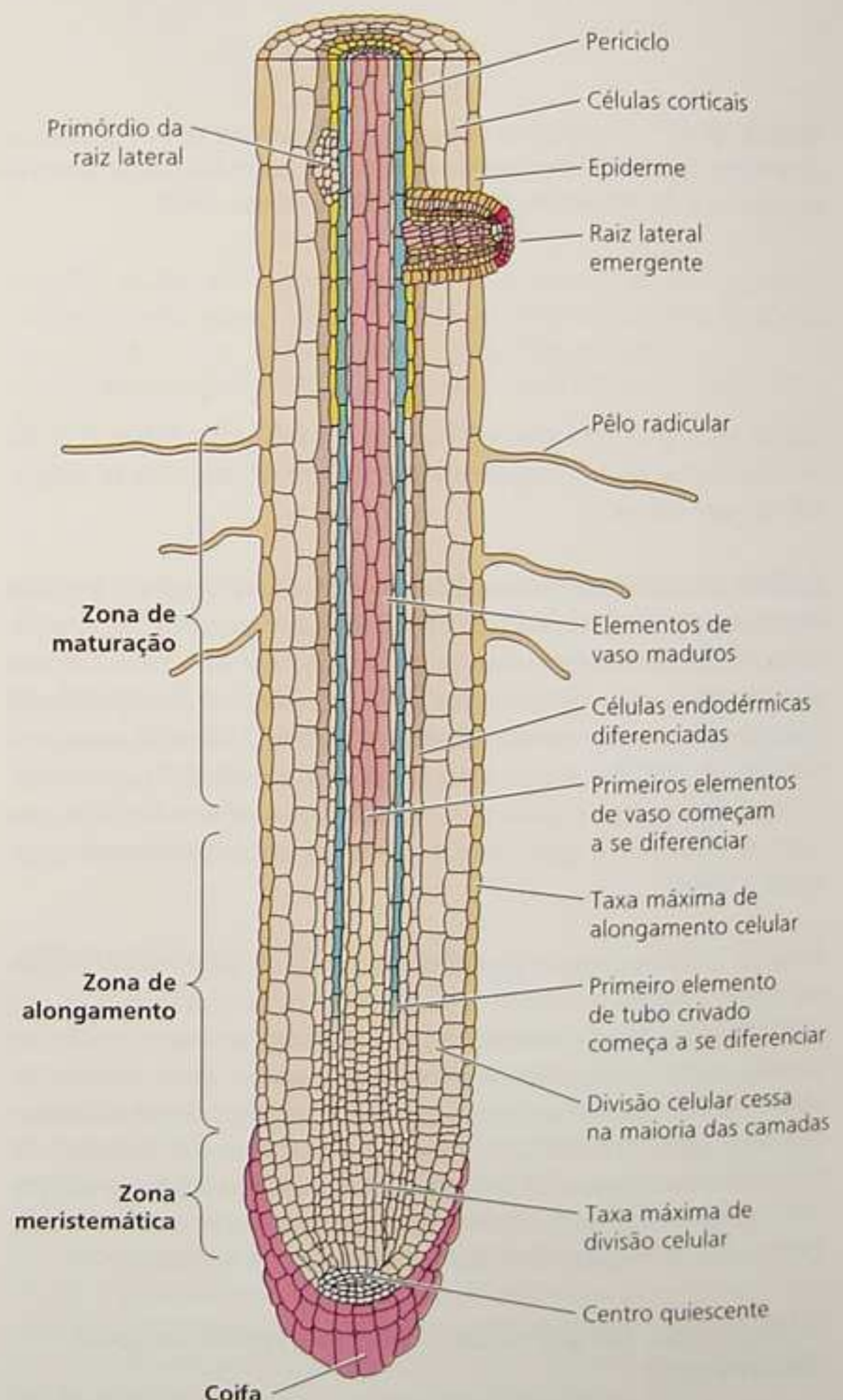



FIGURA 16.17 Diagrama simplificado de uma raiz primária, mostrando a coifa, a zona meristemática, a zona de alongamento e a zona de maturação. As células na zona meristemática têm vacúolos pequenos, expandem-se e dividem-se rapidamente, gerando muitas fileiras de células.

meristema da raiz origina apenas um órgão, a raiz primária. Ela não produz apêndices laterais.

- A **zona de alongamento**, como revela seu nome, é o local de rápido e extensivo alongamento celular. Embora algumas células possam continuar a se dividir enquanto se alongam nessa zona, a taxa de divisão diminui progressivamente a zero com o aumento da distância do meristema.
- A **zona de maturação** é a região na qual as células adquirem sua diferenciação característica. As células entram na zona de maturação após as divisões e o alongamento terem cessado. A diferenciação pode se iniciar muito cedo, porém as células não adquirem o estado maduro até alcançarem essa zona. O padrão radial dos tecidos diferenciados torna-se evidente na zona de maturação. Mais tarde nesse capítulo serão examinada a diferenciação e a maturação de um desses tipos celulares, o elemento traqueal.

Conforme discutidas anteriormente, raízes laterais ou ramificações surgem a partir do periciclo em regiões maduras da raiz. Divisões celulares no periciclo estabelecem meristemas secundários que crescem através do córtex e epiderme, determinando um novo eixo de crescimento (Figura 16.18). Os meristemas primário e secundário da raiz comportam-se de modo similar àquelas divisões de células no meristema que dão origem a progenitoras de todas as células da raiz.

As células-tronco da raiz geram fileiras longitudinais de células

Meristemas são populações de células se dividindo, porém nem todas as células da região meristemática dividem-se à mesma taxa ou com a mesma freqüência. Tipicamente, as células centrais dividem-se muito mais lentamente do que as vizinhas. Essas células que raramente se dividem são chamadas de **centro quiescente** do meristema da raiz (ver Figura 16.17).

As células são mais sensíveis à radiação ionizante quando estão se dividindo. Esta é a base do uso da radiação como tratamento do câncer em humanos. Como resultado, as células do meristema que se dividem rapidamente podem ser mortas por doses de radiação, enquanto células que não se dividem ou dividem-se lentamente, como aquelas do centro quiescente, podem sobreviver. Se as células da raiz que se dividem rapidamente são mortas por radiação ionizante, em muitos casos a raiz pode ser regenerada a partir das células do centro quiescente. Essa capacidade sugere que as células do centro quiescente são importantes para o padrão envolvido na formação de uma raiz.

A característica estrutural mais notável da coifa, quando observada em secção longitudinal, é a presença de uma longa fileira de células relacionadas propagadas de forma clonal. A maioria das divisões celulares na coifa é transversal ou **anticlinal**, com o plano de citocinese orientado em ângulo reto ao eixo da raiz (tal divisão tende a aumentar o comprimento da raiz). Há relativamente poucas divisões **periclinais**, nas quais o plano de divisão é paralelo ao eixo da raiz (tais divisões tendem a aumentar o diâmetro da raiz).

Divisões periclinais ocorrem, na maioria das vezes, próximas à coifa e estabelecem novas fileiras de células. Como resultado, a origem básica de qualquer célula madura particular pode recair em uma ou poucas células no meristema: são as células-tronco de uma fileira particular de células. Em *Arabidopsis*, as células-tronco envolvem o centro quiescente, porém não são partes do mesmo. As células-tronco basicamente podem ser derivadas das células do centro quiescente, contudo esta origem deve ocorrer durante a embriogênese, visto que as células do centro quiescente não se dividem após a germinação no desenvolvimento normal. A análise dos padrões de divisão celular das raízes da pteridófita aquática *Azolla* contribuiu para nossa compreensão detalhada da função do meristema. (para a discussão deste trabalho, ver **Tópico 16.3 na Internet**).

O meristema apical da raiz contém vários tipos de célula-tronco

Os padrões de organização celular encontrado nos meristemas da raiz das plantas com sementes são substancialmente diferentes daqueles em plantas vasculares mais primitivas. Todas as plantas com sementes têm muitas células-tronco, em vez de uma única encontrada em plantas como a pteridófica aquática *Azolla*. Entretanto, são similares à *Azolla* na possibilidade de seguir as fileiras de células

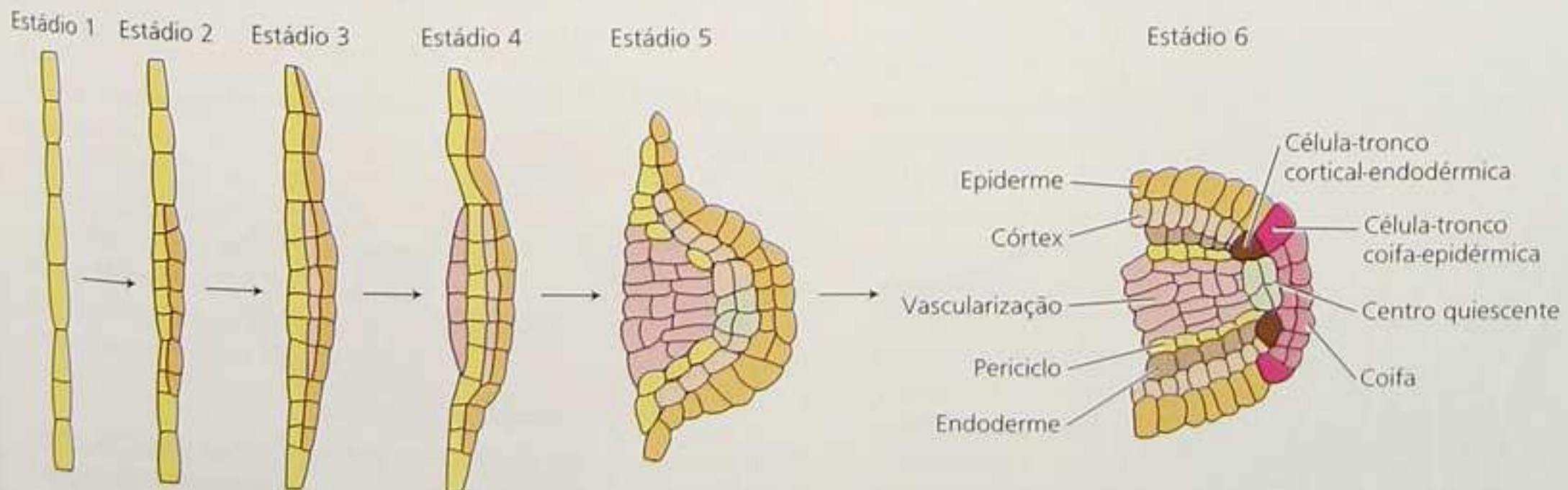



FIGURA 16.18 Modelo de formação de raiz lateral em *Arabidopsis*. Seis estádios principais são mostrados no desenvolvimento do primórdio. Os diferentes tipos de tecidos estão designados por cores. No estádio 6, todos os tecidos encontrados na raiz primária estão presentes no padrão radial típico da ramificação da raiz (Malamy e Benfey, 1997).

da região de maturação até o meristema e, em alguns casos, identificar a célula-tronco da qual foi produzida a fileira.

O meristema apical da raiz de *Arabidopsis* apresenta a seguinte estrutura (Figura 16.19):

- O **centro quiescente** é composto por um grupo de quatro células, também conhecidas como células centrais do meristema da raiz de *Arabidopsis*. As células do centro quiescente da raiz de *Arabidopsis* usualmente não se dividem durante a embriogênese.
- As **células-tronco cortical-endodérmicas** formam um anel de células que circunda o centro quiescente. Estas células-tronco originam as camadas do córtex e da endoderme. Elas sofrem uma divisão anticlinal (i. é, perpendicular ao eixo longitudinal); então, as células-filhas dividem-se periclinalmente (i. é, em paralelo ao eixo longitudinal), estabelecendo as fileiras que dão origem ao córtex e a endoderme, cada uma constituída por uma única camada de células na raiz de *Arabidopsis* (ver também Figuras 16.2 e 16.8C).
- As **células-tronco da columela** são as que se localizam imediatamente acima das células centrais, dividindo-se anticlinal e periclinalmente para originar o setor da coifa conhecido como columela.
- As **células-tronco coifa-epidérmicas** estão no mesmo setor das células-tronco da columela, porém formam um anel ao redor delas. As divisões anticlinais das células-tronco coifa-epiderme originam a camada de células da epiderme. As divisões periclinais da mesma célula-tronco, seguida por divisões anticlinais subseqüentes das derivadas, produzem a coifa lateral.
- As **células-tronco do estelo** são o setor de células exatamente atrás das células do centro quiescente, originando o periciclo e os tecidos vasculares.

As células-tronco, juntamente com suas derivadas imediatas no meristema apical, são chamadas de promeristema.

DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Diferenciação é o processo pelo qual as células adquirem propriedades metabólicas, estruturais e funcionais distintas daquelas de suas células progenitoras. Em plantas, ao contrário dos animais, a diferenciação celular é reversível, particularmente quando células diferenciadas são removidas da planta e colocadas em cultura de tecidos. Sob tais condições, as células desdiferenciam (i. é, perdem suas características diferenciadas), reiniciam a divisão celular e, em alguns casos, quando supridas de nutrientes e hormônios apropriados, regeneram até uma planta toda.

Essa capacidade de desdiferenciar demonstra que as células vegetais diferenciadas retêm a informação genética necessária para o desenvolvimento de uma planta completa, apropriadamente denominada **totipotência**. A única exceção a esta regra são as células que perdem seu núcleo, como os elementos de tubo crivado do

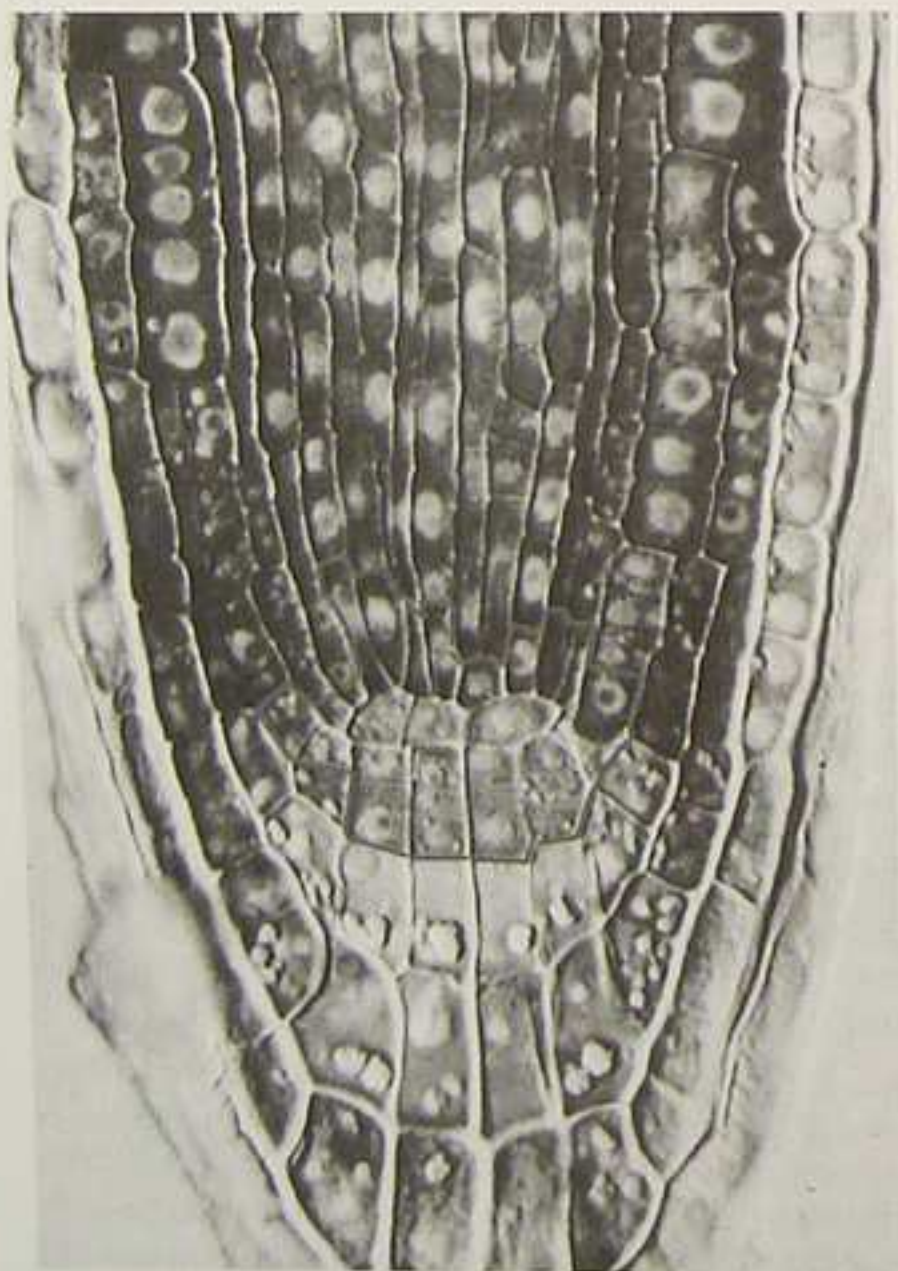
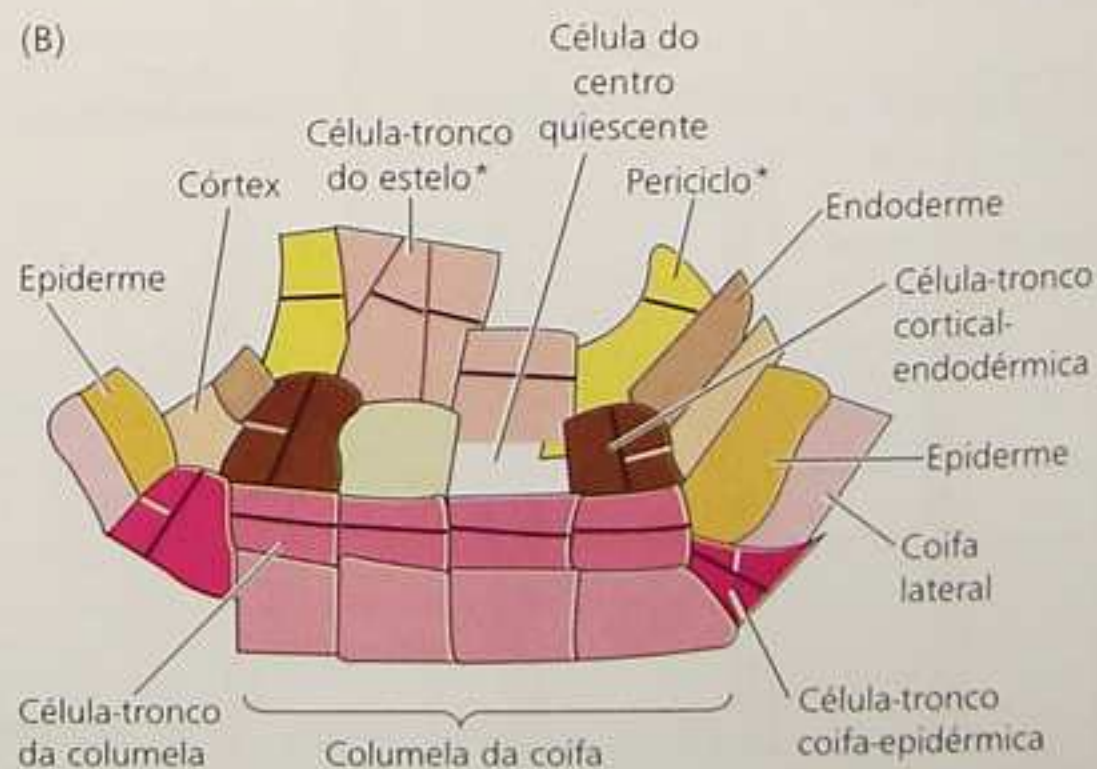



FIGURA 16.19 Todos os tecidos na raiz de *Arabidopsis* são derivados de um número pequeno de células-tronco no meristema apical da raiz. (A) Secção longitudinal através do centro de uma raiz. O promeristema contendo as células-tronco que dão origem todos os tecidos da raiz está delineado. (B) Diagrama da região do promeristema delineada em A. Apenas duas das quatro células do centro quiescente estão representadas nesta secção. As linhas pretas indicam os planos de divisão celular que ocorrem nas células-tronco, enquanto as brancas mostram as divisões celulares secundárias que ocorrem nas células-tronco cortical-endodérmicas e coifa lateral-epidérmicas (Schiefelbein e cols., 1997, cedida por J. Schiefelbein, © the American Society of Plant Biologists, impressa com permissão).

*N. de T. É importante salientar que o periciclo também faz parte do estelo.

floema e células que morrem na maturidade, como os elementos de vaso e traqueídes (referidos coletivamente como elementos traqueais) no xilema.

Como exemplo do processo de diferenciação celular pode-se discutir a formação dos elementos traqueais. O desenvolvimento dessas células, do estádio meristemático ao totalmente diferenciado, ilustra os tipos de controle que as plantas exercem sobre a especialização celular e proporciona um exemplo das mudanças celulares ocasionadas pela diferenciação (Fukuda, 1996).

Uma parede celular secundária se forma durante a diferenciação do elemento traqueal

Conforme descrito no Capítulo 4, os elementos traqueais são células condutoras nas quais água e solutos movem-se pela planta. Eles morrem na maturidade, porém, antes de sua morte, são altamente ativos e constroem uma parede secundária, muitas vezes com padrão elaborado, crescendo extensamente. A morte celular (discutida mais tarde neste Capítulo) é o final geneticamente programado para a diferenciação do elemento traqueal.

A formação das paredes secundárias, durante a diferenciação do elemento traqueal, envolve o depósito de microfibrilas de celulose e outros polissacarídeos não-celulósicos em sítios específicos sobre a parede primária ou secundária, resultando no espessamento de parede com padrão característico (ver Capítulo 15). As paredes secundárias dos elementos traqueais têm um conteúdo de celulose maior do que as paredes primárias, impregnadas por lignina, a qual não está usualmente presente nas paredes primárias.

Em regiões de crescimento rápido o material da parede secundária é depositado como discretos anéis ou no padrão helicoidal, com os espessamentos separados por regiões de parede primária (Figura 16.20). Com o crescimento celular, a parede celular se estende e os anéis ou helicóides são fragmentados. Os elementos traqueais formados após a interrupção do alongamento em geral têm paredes espessadas, espessamentos esses que podem ser de padrão uniforme ou reticulado. Tais células não podem se estender por crescimento.

Os microtúbulos participam na determinação do padrão de deposição da parede secundária. Antes de ser evidente qualquer alteração no padrão de deposição de parede, microtúbulos corticais mudam de uma distribuição mais ou menos uniforme ao longo das paredes longitudinais da célula, para agrupamentos em faixas (regiões determinadas) (Figura 16.21A). A parede secundária é então depositada abaixo dos grupos de microtúbulos (ver Figura 16.21B).

A orientação das microfibrilas de celulose no interior do espessamento de parede secundária é um reflexo do alinhamento dos microtúbulos no citoplasma cortical (Hepler, 1981). Se os microtúbulos são destruídos com um agente antimicrotúbulo como a colchicina, o depósito na parede celular pode continuar, porém as microfibrilas de celulose não são mais ordenadas de forma precisa no interior do espessamento e o padrão de parede secundária desorganiza-se (Figura 16.22).

Protoxilema
Metaxilema
Floema primário

FIGURA 16.20 A formação de xilema primário e floema primário de um feixe em desenvolvimento em um entrenó jovem de pepino (*Cucumis sativus*). O padrão de depósito secundário de parede durante o desenvolvimento dos elementos traqueais varia de acordo com a taxa de alongamento celular. Os dois primeiros elementos traqueais a se diferenciarem — o protoxilema — são observados à esquerda, com espessamento secundário de parede segundo o padrão em anéis. Como o primeiro elemento traqueal formado foi fortemente estendido pelo crescimento do entrenó, os anéis estreitos são fragmentados. Os elementos traqueais do metaxilema se diferenciam após o protoxilema e são caracterizados por espessamento helicoidal. O elemento traqueal do metaxilema formado inicialmente tem o espessamento helicoidal estendido, devido ao alongamento celular, enquanto o elemento traqueal formado mais tarde exibe um espessamento helicoidal denso, que não foi estendido pelo alongamento. Os tubos crivados primários são mostrados à direita, com seus típicos elementos delicados. Suas placas crivadas estão coradas de azul escuro e o citoplasma de azul claro (R. Aloni).

INICIAÇÃO E REGULAÇÃO DE ROTAS DE DESENVOLVIMENTO

Rápidos progressos têm sido obtidos na identificação de genes que desempenham papéis críticos na regulação do crescimento, diferenciação celular e formação de padrões. Este progresso é, em grande parte, uma conseqüência de um intenso esforço internacional com foco em *Arabidopsis* — primeiro para seqüenciar seu genoma e, subseqüentemente, para compreender a função de todos os seus genes. Entretanto, muitas descobertas importantes têm sido realizadas como resultado de estudos com outras espécies, incluindo *Antirrhinum*, milho, petúnia, tomate e tabaco.

Na maioria dos casos, genes importantes para o desenvolvimento foram revelados por análises elaboradas da descendência de plantas mutantes, para encontrar mutantes individuais com desenvolvimento alterado (ver o exemplo na Figura 16.8B). Tais estudos muitas vezes envolveram esforços heróicos para mapear, clonar e seqüenciar o gene mutante, embora hoje seu genoma esteja seqüenciado, a via de identificação de qualquer gene mutante particular e o que ele codifica seja mais curta em *Arabidopsis*.

Até o momento, foram identificados alguns dos jogadores, porém as regras do jogo e os papéis específicos da maioria dos genes ainda estão sendo desenvolvidos. Entretanto, muitos desses

FIGURA 16.21 Desenvolvimento de espessamento secundários de parede em elementos traqueais de raízes da pteridófita aquática *Azolla*. (A) Electromicrografia de uma seção através de uma célula em diferenciação. Grupos de microtúbulos são vistos no córtex, formando faixas no local de espessamento de parede antes da parede secundária começar a se formar. Muitas vesículas pequenas localizam-se ao longo dos microtúbulos. (B) Espessamentos em anel desenvolvem-se abaixo das faixas de microtúbulos e são hemisféricos de perfil (cedidas por A. Hardham).

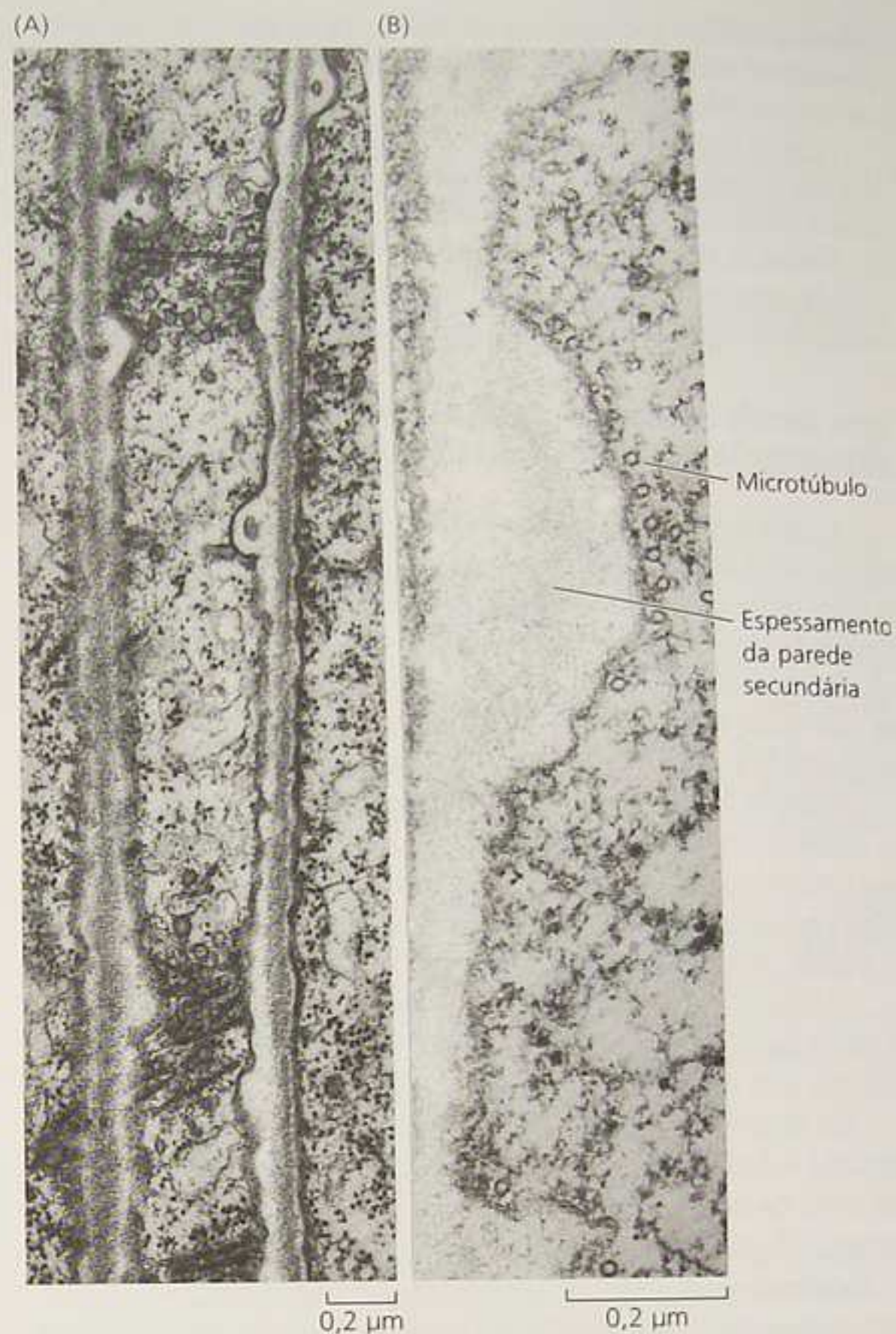
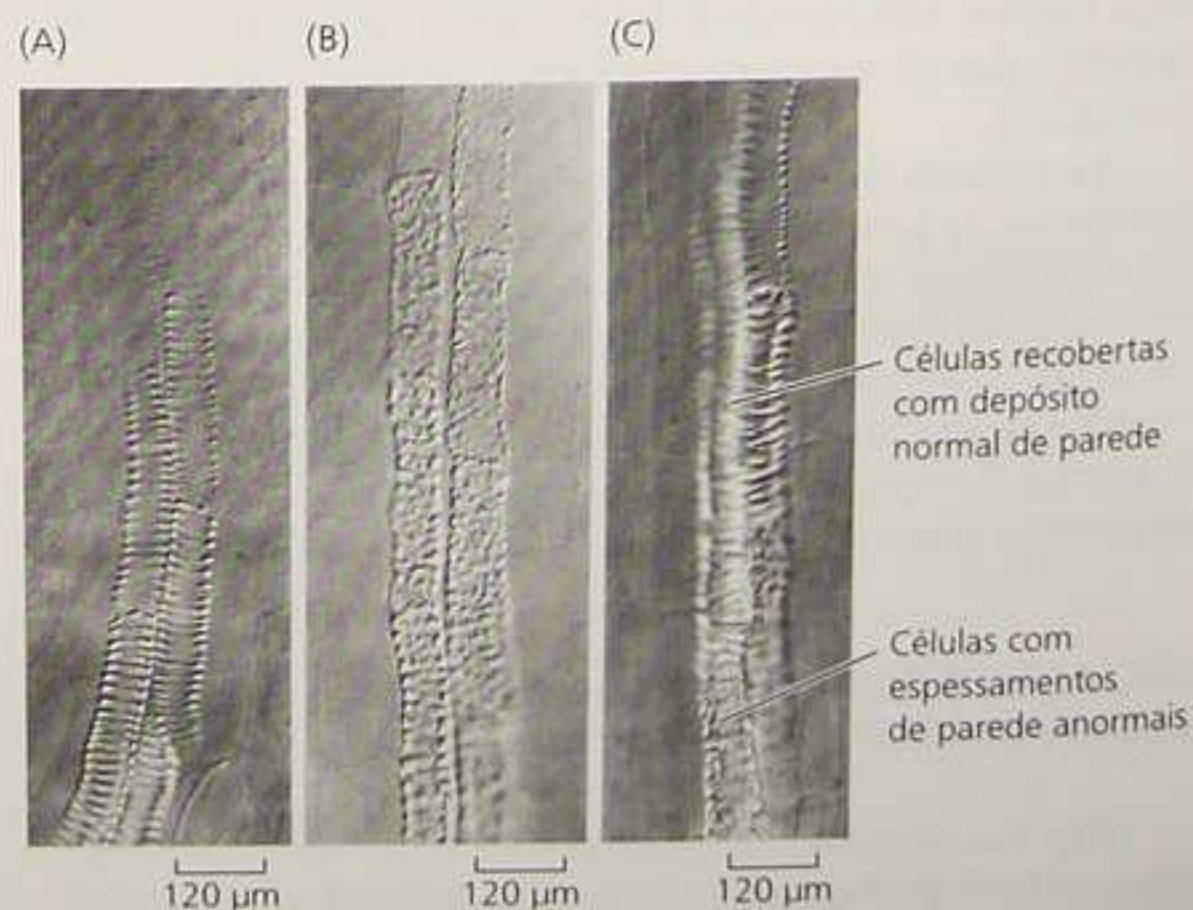



FIGURA 16.22 Os tratamentos com colchicina que provocam a destruição de microtúbulos também rompem a formação normal de espessamentos da parede secundária, em elementos traqueais em diferenciação. (A) Durante o crescimento normal da raiz em *Azolla*, os espessamentos de parede estão espaçados uniformemente ao longo das paredes laterais. (B) Na presença de colchicina, os materiais de parede secundária são depositados segundo padrões irregulares. (C) O crescimento normal é retomado, quando as raízes são transferidas para um meio fresco sem colchicina e os elementos traqueais recentemente formados apresentam espessamentos normais em anel (A de Hardham e Gunning, 1979; B e C de Hardham e Gunning, 1980).

genes importantes para o desenvolvimento foram encontrados codificando fatores de transcrição (proteínas com a capacidade de se ligar a seqüências específicas de DNA e, assim, controlar a expressão de outros genes) ou componentes de rotas de sinalização. A natureza desses genes sugere alguns caminhos possíveis que possam regular o desenvolvimento.

Foi possível identificar princípios importantes do desenvolvimento vegetal onde esses estudos genéticos moleculares foram associados a análises clonais e a estudos biológicos, fisiológicos e/ou bioquímicos celulares. Embora se esteja longe de uma completa compreensão, essas percepções incluem o seguinte:

- A expressão de genes que codificam fatores de transcrição determina a identidade da célula, tecido e órgão.
- O destino de uma célula é determinado por sua posição, e não sua história clonal.
- As rotas do desenvolvimento são controladas por uma rede de interação de genes.
- O desenvolvimento é regulado por sinalização de célula a célula.

Na discussão a seguir, será examinada em primeiro lugar, a natureza de algum fator de transcrição e de transdução de sinal constituintes de genes que demonstraram desempenhar papel-chave no desenvolvimento. Assim, se irá delinear em maior detalhe cada um dos princípios de desenvolvimento aqui descritos.

Genes de fatores de transcrição controlam o desenvolvimento

Com a conclusão do seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis* tornou-se evidente que, aproximadamente, 1.500 dos 26.000 genes codificam fatores de transcrição (Riechmann e cols., 2000). **Fatores de transcrição** são proteínas que têm uma afinidade por DNA e capacidade de ativar ou desativar a expressão de genes por ligações a seqüências específicas de DNA (ver **Capítulo 14 na Internet**).

Estes 1.500 genes de fatores de transcrição pertencem a numerosas famílias. Menos da metade de tais famílias é encontrada apenas em plantas, mas a maioria está em todos os eucariontes. Agora sabe-se ou pode ser estimado nesta oportunidade como muitos desses genes de fatores de transcrição regulam rotas de desenvolvimento, pois somente uma percentagem pequena dos mesmos foi estudada. Contudo, muitos membros destas duas famílias — os MADS *box* e genes *homeobox* — são constatados como particularmente importantes no desenvolvimento vegetal.

Os **genes MADS *box*** são reguladores-chave de funções biológicas em plantas, animais e fungos.[2] Existem cerca de 30 genes MADS *box* no genoma de *Arabidopsis*, muitos dos quais controlam aspectos do desenvolvimento. Os genes MADS *box* específicos são importantes para eventos de desenvolvimento na raiz, folha, flor, rudimento seminal e fruto (Riechmann e Meyerowitz, 1997). Eles controlam a expressão de conjuntos específicos de genes-alvo, embora, neste ponto, a maioria permaneça não identificada.

Todo gene MADS *box* é expresso de uma maneira temporalmente específica e restrita espacialmente, com sua expressão determinada por outros genes ou eventos de sinalização. Isto está mais bem evidenciado no caso do desenvolvimento da flor, onde se mostrou que conjuntos interativos de genes MADS *box* determinam a identidade de órgãos florais (ver Capítulo 24).

Os **genes *homeobox*** codificam proteínas do homeodomínio que atuam como fatores de transcrição. Em todos os eucariontes, as **proteínas do homeodomínio** desempenham um papel principal na regulação de rotas do desenvolvimento (ver **Capítulo 14 na Internet**). Como acontece com os genes MADS *box*, cada gene *homeobox* participa da regulação de um evento singular do desenvolvimento, pelo controle da expressão de um conjunto único de genes-alvo.

As proteínas do homeodomínio pertencentes à classe KNOTTED1 (KN1) estão envolvidas na manutenção do caráter indeterminado do meristema apical do caule. A mutação original *knotted* (*kn1*) foi encontrada no milho e é uma mutação de ganho de função. Nas mutações **ganho de função** ou **dominantes**, o fenótipo resulta da expressão anormal de um gene. Em contraste, os fenótipos de mutações de **perda de função** resultam da perda da expressão gênica e as mutações, por isso são **recessivas**.

As plantas com a mutação *kn1* apresentam nódulos do tipo tumor, pequenos e irregulares, ao longo das nervuras foliares. Es-

FIGURA 16.23 A expressão inadequada do gene *KN1* durante o desenvolvimento foliar causa anormalidades severas ao redor das nervuras foliares. A mutação *kn1* ganho de função provoca proliferação celular após cessar a divisão celular normal; além disso, os planos de divisão são anormais, causando distorção maciça da superfície da lâmina (Sinha e cols., 1993a, cedida por S. Hake).

[2] O nome MADS tem origem nas iniciais dos primeiros quatro membros da família de fatores de transcrição: MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS e SRF.

tes nódulos resultam de divisões celulares anormais dentro dos tecidos vasculares que deformam as nervuras, provocando protuberâncias na superfície foliar (Figura 16.23) (Hake e cols., 1989).

A diferenciação celular é relativamente normal nas folhas de plantas mutantes *kn1*, exceto na vizinhança dos nódulos, os quais são similares aos meristemas, pois contêm células indiferenciadas e continuam a se dividir, após as células ao seu redor terem amadurecido e cessado a divisão. Este comportamento sugere que o gene *KN1* controla a função do meristema. O fenótipo mutante resulta da expressão do gene nos tecidos danificados, em vez da perda do padrão normal de expressão do desenvolvimento. Os genes *homeobox* tipo *KNOTTED1* ou KNOX têm sido encontrados em várias outras espécies. *Arabidopsis* tem três: *KNAT1*, *KNAT2* e *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) (Lincoln e cols., 1994; Long e cols., 1996).

As plantas de tabaco que são transformadas com o gene *KN1* do milho, governado por um promotor que expressa o gene por meio da planta, desenvolvem numerosos meristemas caulinares adventícios ao longo das superfícies foliares (Sinha e cols., 1993b). Estas anormalidades são similares à mutação *kn1* ganho de função original. A partir daí, pode-se concluir que a correta expressão do gene *KN1* está envolvida na definição da função do meristema.

Muitas rotas de sinalização de plantas utilizam proteínas quinases

As proteínas quinases são enzimas ATP-dependentes que adicionam grupos fosfato às proteínas. A fosforilação protéica é um mecanismo-chave utilizado extensivamente para regular a atividade de enzimas e de fatores de transcrição. Embora utilizadas amplamente por todos os eucariontes, os genomas vegetais são especialmente ricos em genes que codificam tais enzimas. O genoma de *Arabidopsis* contém mais de 1.200 genes que codificam proteínas quinases. Destes, mais de 600 codificam *proteínas quinases receptoras* (ver **Capítulo 14 na Internet**) (Shiu e Bleecker, 2001).

As funções da maiorias dessas proteínas quinases receptoras são desconhecidas, mas recentemente tem sido mostrado que algumas desempenham papéis de sinalização importantes no desenvolvimento vegetal. *Arabidopsis* possui dois desses genes: *BRI1*, o qual codifica uma quinase receptora que funciona na sinalização de brassinosteróide (ver **Tópico 19.14 na Internet**), e *CLAVATA1* (*CLV1*), que codifica uma quinase receptora, participante da regulação do tamanho da população celular não-comprometida no meristema apical do caule (*CLV1* será discutido mais adiante neste capítulo).

As **quinases receptoras** tipicamente são proteínas integrais de membrana. O domínio receptor dessas quinases localiza-se externamente à membrana plasmática; o domínio catalítico da quinase está no interior da célula, ligado ao domínio receptor por um domínio transmembrana. O domínio receptor tem afinidade por uma molécula de sinalização, freqüentemente uma proteína pequena ou peptídeo, denominado **ligante receptor.**

Na ausência do ligante, a enzima quinase é inativa. A ligação do ligante ao receptor converte a proteína em uma quinase ativa (Figura 16.24). No caso de CLV1, a ligação do ligante também desencadeia a formação de um complexo que consiste de uma proteína relacionada, CLAVATA, uma proteína fosfatase associada à quinase (KAPP; do inglês, *kinase-associated protein phosphatase*) e uma proteína rho relacionada à GTPase. O ligante mais provável para CLV1 é uma proteína pequena, codificada por uma terceiro gene *CLAVATA*, *CLV3* (ver Figura 16.24) (Clark e cols., 1993; Clark, 2001).

Os genes *CLAVATA* foram primeiro identificados como mutações que levam a um aumento de tamanho do meristema apical da parte aérea vegetativa e meristemas florais. Um resultado foi um aumento no número de órgãos laterais produzidos pelos meristemas desses mutantes, que é particularmente evidente no número de órgãos florais produzidos pelos meristemas dos mutantes. Enquanto o *CLV1* codifica uma proteína quinase do tipo receptora, *CLV2* codifica outra proteína com um domínio receptor similar àquele de CLV1, mas sem um domínio quinase. A proteína codificada pelo gene *CLV3* não é relacionada com CLV1 nem com CLV2.

O destino da célula é determinado por sua posição

Tanto no meristema da raiz quanto do caule, um número pequeno de células-tronco é a fonte final de qualquer tecido particular; as células de um determinado tecido, na sua maioria, são clonais, tendo se originado a partir da mesma célula-tronco. Contudo, a maior parte das evidências sustenta a opinião que *o destino da célula não depende da linhagem celular, mas, em vez disso, é determinado pela informação posicional* (Scheres, 2001).

Na grande maioria dos caso, as células epidérmicas da parte aérea são derivadas de um número pequeno de células-tronco na camada L1. No entanto, as derivadas da camada L1 estão comprometidas em se tornarem células epidérmicas, pois elas ocupam a camada mais externa e localizam-se no topo da camada celular cortical, e não porque elas foram derivadas por clonagem das células-tronco na camada L1.

O plano em que uma célula se divide irá determinar a posição das suas células-filhas dentro do tecido, posição que, por sua vez, desempenha o papel mais importante na determinação do destino das células-filhas. A evidência mais forte da importância da posição na determinação do destino final da célula provém do exame do destino de células que são deslocadas da sua posição normal, de tal modo que elas passam a ocupar uma camada diferente.

As divisões nas camadas L1 e L2 do meristema, na grande maioria, são anticlinais e estas divisões são responsáveis pela geração de camadas no primeiro local. Todavia, ocorrem divisões periclinais ocasionais, originando uma derivada que ocupa a camada adjacente. Estas divisões periclinais não alteram a composição do tecido derivado desta camada. Em vez disso, as derivadas assumem uma função que é própria de uma célula ocupante daquela camada.

Outro apoio à importância da posição na determinação do destino da célula é obtido de observações da diferenciação celular em folhas da hera (*Hedera helix*), que possui um misto de células mutantes e do tipo selvagem. Quando ocorre uma mutação em uma célula-tronco no meristema apical do caule, todas as células derivadas daquela célula-tronco serão mutantes. Uma planta nesta situação é uma **quimera**, uma mistura de células com uma constituição genética diferente. A análise de quimeras tem aplicação em estudos sobre a origem clonal de tecidos diferentes.

Quando a mutação afeta a capacidade de diferenciação dos cloroplastos, a presença de setores albinos evidencia que os mesmos foram derivados de células-tronco portadoras de mutação. Na hera mostrada na Figura 16.25, a camada L2 apresenta uma mutação determinante de albinismo e as camadas L1 e L3 possuem uma cópia do tipo selvagem do mesmo gene. A camada L1 origina a epiderme da folha e do caule, mas ela não tem cor porque os cloroplastos não se diferenciam na maioria das suas células. O mesofilo tipicamente é derivado da camada L2, de modo que as fo-

EXTERIOR DA CÉLULA

2. A ligação do multímero CLV3 ao domínio extracelular do heterodímero CLV1/CLV2 induz a autofosforilação do domínio citoplasmático de CLV1.

3. CLV1 fosforilada se liga às moléculas efetoras *downstream*: proteína fosfatase associada à quinase (KAPP) e rho-GTPase (ROP).

Membrana plasmática

Heterodímero CLV1/CLV2

4. KAPP é um regulador negativo de CLV1.

CLV3 ← *WUS* ⊣ MAPKs?

1. A expressão do gene *WUS* promove a expressão do gene *CLV3*.

5. ROP pode atuar por intermédio de uma cascata de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) para reprimir a expressão do gene *WUS*, formando um circuito de *feedback* negativo.

CITOPLASMA

FIGURA 16.24 Modelo da cascata de sinalização da quinase receptora CLAVATA1/CLAVATA2 (CLV1/CLV2), formando um circuito de *feedback* negativo com o genes *WUS*. Para mais informações sobre as rotas de sinalização da quinase receptora, ver **Capítulo 14 na Internet** (Clark, 2001).

lhas deveriam ser brancas, pois as células-tronco desta camada são portadoras do gene mutante e o transmitem para as suas derivadas.

Embora poucas folhas sejam brancas ou quase, a maioria das folhas exibe manchas verdes. Elas são **variegadas**. O tecido verde destas folhas foi derivado de células originalmente na camada L1 ou L3; as regiões sem pigmentos foram derivadas da camada L2. Ocorre o caráter variegado porque, precocemente no desenvolvimento foliar, divisões periclinais ocasionais na camada L1 ou L3 estabelecem clones de células que podem se diferenciar como células verdes do mesofilo. Esta é uma evidência adicional que a diferenciação celular não depende da linhagem celular. O destino de uma célula durante o desenvolvimento é determinado pela posição que ela ocupa no corpo da planta.

As rotas de desenvolvimento são controladas por redes de genes que interagem

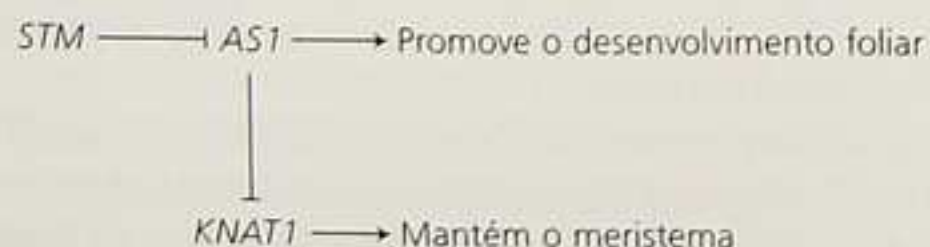
Tem-se uma grande tarefa ao estudar as redes reguladoras que controlam as rotas de desenvolvimento. Não obstante, várias descobertas apontam para um modelo em que eventos de sinalização local e de longa distância controlam a expressão de genes que codificam fatores de transcrição, os quais, por sua vez, determinam o caráter ou atividades de um determinado tecido ou célula. Freqüentemente, tais mecanismos envolvem circuitos de *feedback* onde dois ou mais genes interagem, fazendo com que um regule a expressão do outro. Estas interações são vistas mais claramente no meristema apical do caule.

A expressão do gene *KNOX* do tipo *STM* (*SHOOTMERISTEMLESS*) é essencial para a formação do meristema apical do caule no embrião de *Arabidopsis* e para a função meristemática na planta em crescimento. O *STM* é expresso inteiramente no domo apical do meristema vegetativo, exceto nos primórdios foliares em desenvolvimento. De maneira similar, o *STM* é expresso no domo do meristema floral, mas ele é inativado quando aparecem os órgãos florais. Dois genes *KNOX* adicionais — *KNAT1* e *KNAT2* — também são expressos no meristema apical de *Arabidopsis* e participam da manutenção de células meristemáticas em um estado indiferenciado.

Uma vez que as células dividem-se ativamente nos estádios iniciais do desenvolvimento dos primórdios foliares e florais, o *STM* não é necessário para a divisão celular. Mais exatamente, *KN1*, *STM* e seus homólogos funcionais mantêm a identidade meristemática pela supressão da diferenciação. Um outro gene, *ASYMETRIC LEAVES1* (*AS1*), promove o desenvolvimento foliar e é expresso nos primórdios e folhas jovens de *Arabidopsis* (Figura 16.26) (Byrne e cols., 2000). O *STM* reprime a expressão de *AS1*, enquanto este,

FIGURA 16.25 As quimeras periclinais na hera (*Hedera helix*) demonstram que o mesofilo tem mais de uma única origem clonal. Estas folhas variegadas fornecem indicações sobre as origens clonais de tecidos diferentes. Em algumas das células iniciais do meristema ocorreu uma mutação em um gene essencial para o desenvolvimento de cloroplastos. Nas células derivadas destas células-tronco mutantes não há cloroplastos e elas são brancas, enquanto as células derivadas de outras células-tronco têm cloroplastos normais e mostram-se verdes (cedida por S. Poethig).

por sua vez, reprime a expressão de *KNAT1* nos primórdios foliares em desenvolvimento (Ori e cols., 2000).

STM ——┤ *AS1* ——→ Promove o desenvolvimento foliar
(*STM* ——┤ *KNAT1*)
KNAT1 ——→ Mantém o meristema

O gene *WUSCHEL* (*WUS*), que codifica um outro fator de transcrição de homeodomínio, é um regulador-chave do caráter indeterminado da célula-tronco (Laux e cols., 1996). Em plantas com mutações *wus* de perda de função, falta totalmente um meristema apical ou suas células-tronco são consumidas após terem formado algumas folhas. Os genes *CLAVATA* regulam negativamente a expressão de *WUS*, a qual é expandida nos mutantes *clv1* e *clv3* (Figura 16.27). Inversamente, a expressão de *WUS* regula positivamente a expressão do gene *CLV3* (ver Figura 16.24) (Brand e cols., 2000).

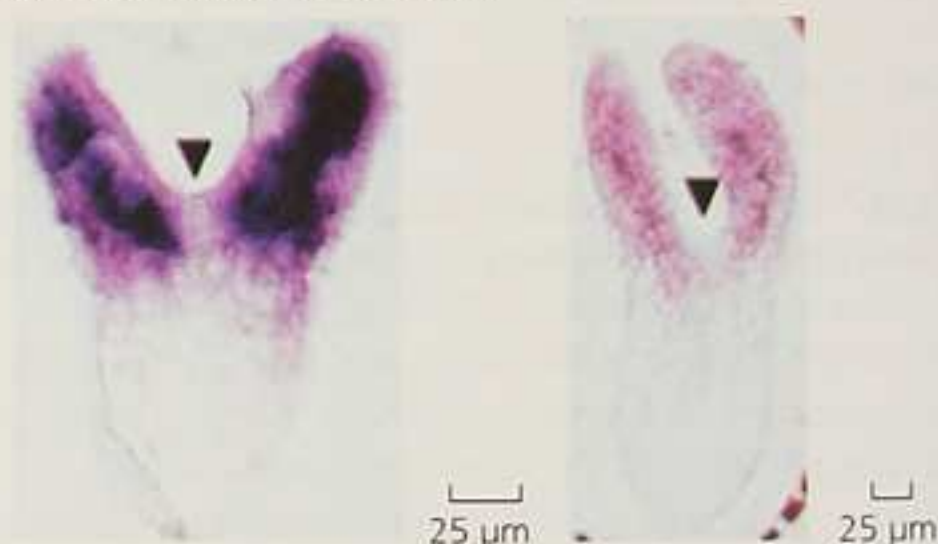
O desenvolvimento é regulado pela sinalização célula-a-célula

Como as células sabem onde estão? Se o destino de uma célula é determinado por sua posição e não por sua linhagem clonal, as células precisam, então, ser capazes de sentir sua posição em relação às outras células, tecidos e órgãos. Células vizinhas, bem como tecidos e órgãos distantes, proporcionam informação quanto à posição. As células em plantas multicelulares normalmente estão em íntimo contato com outras ao seu redor, sendo o comportamento de cada uma cuidadosamente coordenado com suas vizinhas por toda a vida da planta. Além disso, cada célula ocupa uma posição específica dentro do tecido e órgão aos quais ela pertence.

A coordenação da atividade celular exige a comunicação célula a célula, significando que alguns genes importantes para o desenvolvimento atuam de maneira *não-autônoma*. Eles não precisam ser expressos em uma determinada célula para afetar o destino dela. Um determinado gene ou conjunto de genes podem exercer um efeito sobre o desenvolvimento de células vizinhas ou mesmo de células em tecidos distantes pela comunicação célula a célula, por intermédio de, ao menos, três mecanismos diferentes:

1. Sinalização induzida por ligantes.
2. Sinalização hormonal.
3. Sinalização pelo tráfego de proteínas regulatórias e/ou mRNAs.

(A) Embriões do tipo selvagem

25 μm 25 μm

(B) Embriões mutantes *stm*

25 μm 25 μm

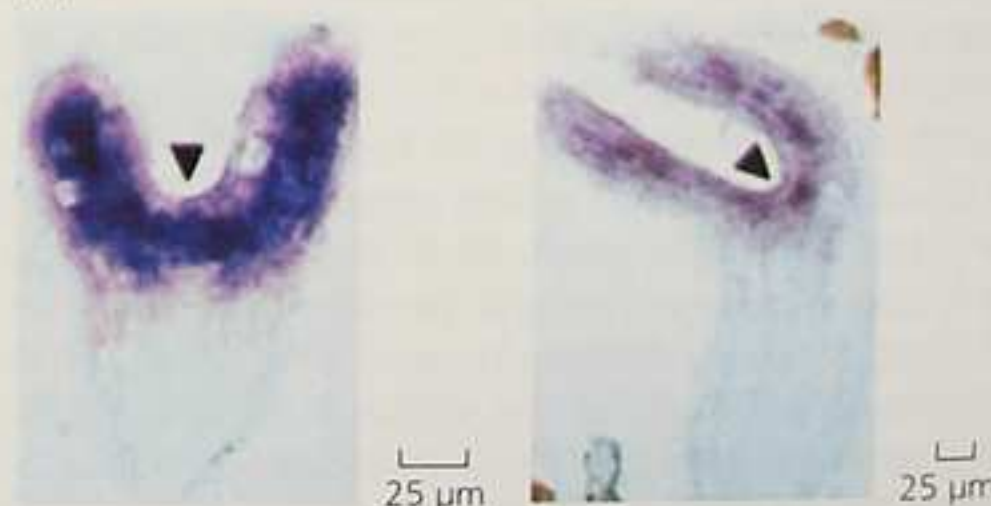



FIGURA 16.26 O gene de identidade meristemática, *STM*, inibe a expressão do gene *ASYMETRIC LEAVES1* (*AS1*), que promove o desenvolvimento foliar em *Arabidopsis*. As setas apontam para a região de formação do meristema apical do caule. (A) No tipo selvagem, a expressão do gene *STM* está normalmente confinada ao meristema apical do caule e ele confere identidade meristemática ao meristema vegetativo. O gene *AS1*, em contraste, está confinado aos primórdios foliares e cotilédones em desenvolvimento no tipo selvagem, conforme mostrado por hibridização *in situ* para embriões em dois estágios de desenvolvimento. (B) Em mutantes *stm*, a expressão de *AS1* expande-se para a região que normalmente se torna o meristema apical do caule. Como conseqüência, o meristema apical não se forma (Byrne e cols., 2000).

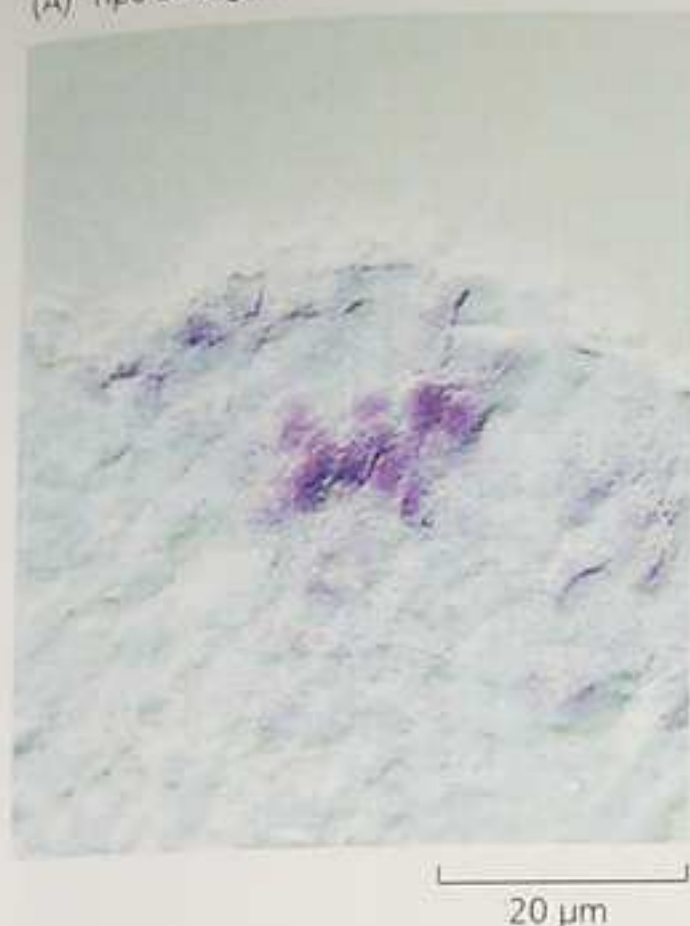



FIGURA 16.27 Expressão do gene *WUS* no meristema apical do caule do tipo selvagem e do mutante *clv3*. A localização do mRNA de *WUS* foi detectada por um procedimento de hibridização *in situ*. (A) No tipo selvagem, a expressão do *WUS* é restrita a um grupo pequeno de células. (B) No mutante *clv3*, a expressão do *WUS* expande-se apical e lateralmente, e o meristema apical propriamente dito está alargado (Brand e cols., 2000).

Sinalização induzida por ligantes. Há evidência que componentes de parede celular, em particular as macromoléculas glicoprotéicas, conhecidas como **proteínas arabinogalactanas** ou **AGPs**, podem comunicar informação de posição que determinarão o destino celular (ver Capítulo 15). As AGPs não estariam envolvidas na sinalização à distância, mas, sim, no contato de uma determinada célula com suas vizinhas. A informação, então, programaria a célula para diferenciar ou adquirir um destino apropriado para a sua posição.

Uma vez que as plantas têm numerosas, talvez centenas, de quinases receptoras, pode-se esperar muitos eventos de sinalização a serem iniciados por fosforilação protéica induzida por ligantes. Todavia, até o momento são conhecidos relativamente poucos ligantes ativando proteínas quinases. Mas existe boa evidência que a pequena proteína codificada pelo gene *CLV3* é o ligante que ativa a proteína quinase CLV1.

A proteína CLV3 é constituída de menos do que 100 aminoácidos e contém uma seqüência-líder, sugerindo que ela seria excretada a partir de células que a produzem (Flechter e cols., 1999). Devido ao seu tamanho pequeno e à sua solubilidade em água, ela poderia se difundir livremente pelo espaço extracelular ou apoplasto.

O **apoplasto** consiste principalmente do espaço ocupado pelas paredes celulares. As macromoléculas da parede celular são amplamente hidrofílicas, e a parede contém passagens entre as macromoléculas com um poro aparente de 3,5 a 5 nm, o que significa que moléculas com uma massa com menos do que aproximadamente 15 kDa podem se difundir livremente pelo apoplasto. Com um peso molecular de cerca de 11 kDa, a proteína CLV3 facilmente poderia se difundir pelo apoplasto.

O gene *CLV3* é expresso em células das camadas L1 e L2 na zona central do meristema apical do caule, mas não dentro da camada L3 ou na zona periférica. Ao contrário, o gene *CLV1* é expresso em camadas mais profundas dentro da zona central na camada L3, como é o gene *WUS*. Entretanto, *CLV1* é expresso dentro de um domínio algo mais amplo do que *WUS* (Figura 16.28). Embora a expressão do gene *WUS* seja exigida para manter a identidade da célula-tronco, ele é expresso em apenas um número pequeno de células na camada L3 do meristema, que funciona de maneira não-autônoma, atuando sobre células a uma distância pequena a partir de células que expressam o gene.

A proteína CLV3 controla o tamanho da população de células-tronco no ápice caulinar, pela regulação negativa da expressão de *WUS* na camada L3. O gene *CLV3* é expresso em células na zona central do meristema, dentro das camadas L1 e L2. Quando *CLV1* ou *CLV3* é desativado por mutação, a expressão do gene *WUS* amplia-se e o número de células-tronco indiferenciadas se expande (Brand e cols., 2000). Uma vez que esta expansão exige *CLV1*, é provável que a proteína CLV3 se difunda a partir de células da L1 e se ligue ao domínio receptor de CLV1 para ativar seu domínio quinase, iniciando um sinal que reprime a transcrição do gene *WUS*.

A expressão de *WUS* promove a expressão de *CLV3*, que, por sua vez, reprime a expressão de *WUS*. Assim, o meristema tem um mecanismo de *feedback* sensível para o controle do tamanho da população de células-tronco.

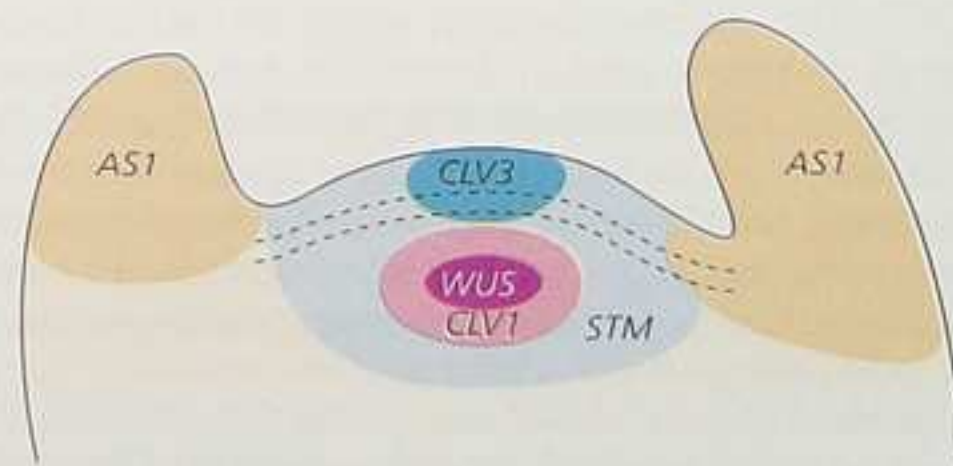
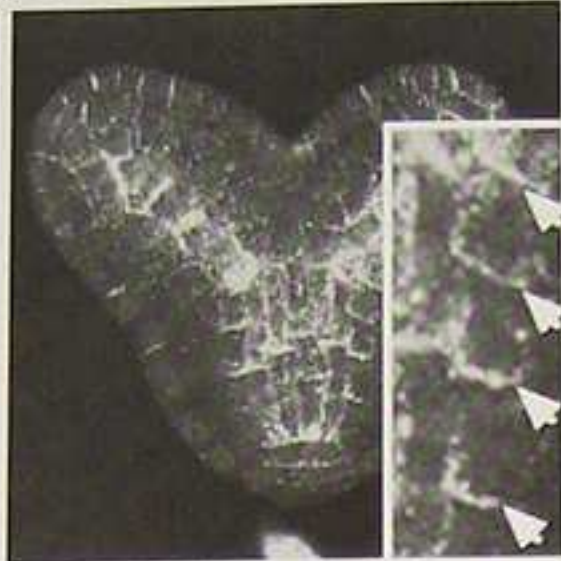



FIGURA 16.28 Padrões de expressão de alguns genes importantes para o desenvolvimento, no meristema apical do caule de *Arabidopsis* (Clark, 2001).

Embriões do tipo selvagam

(A) Globular inicial (B) Metade de coração

Embriões mutantes *gnom*

(C) Globular inicial (D) Metade de coração

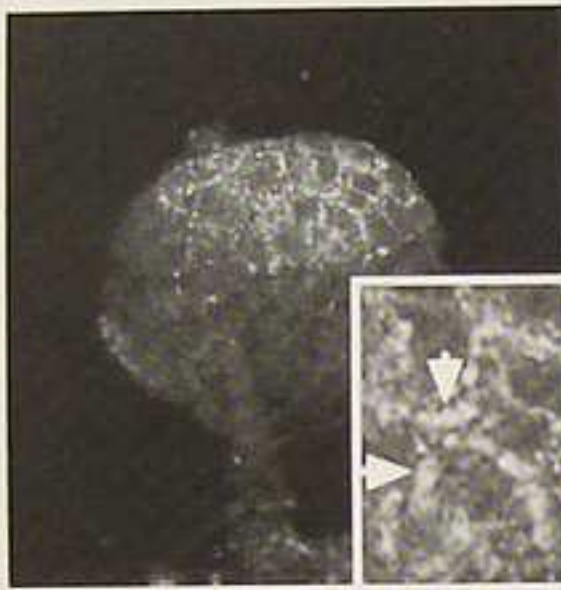



FIGURA 16.29 Comparação dos padrões de distribuição da proteína PIN1 de efluxo de auxina, em embriões de *Arabidopsis* do tipo selvagem e mutante *gnom*. (A) Tipo selvagem, globular inicial; PIN1 está localizada no tecido pró-vascular muito cedo no estádio globular inicial, onde a proteína se acumula no limite basal das quatro células internas que darão origem ao tecido provascular. (B) Tipo selvagem, metade de coração; no estádio de coração, as células provasculares têm proteína PIN1 acumulada nas suas extremidades basais (ver detalhe). (C) Mutante *gnom*, globular inicial; PIN1 não se acumula na região onde o tecido provascular será formado no estádio globular inicial do mutante *gnom* (Steinmann e cols., 1999). (D) Mutante *gnom*, metade de coração; a formação do tecido provascular é bloqueada no mutante *gnom* e o desenvolvimento normal é rompido. A PIN1 se mantém inserida na membrana, mas a localização está desorganizada (ver detalhe) (Steinmann e cols., 1999).

Sinalização hormonal. Os hormônios vegetais — auxina, etileno, giberelinas, ácido abscísico, citocininas e brassinosteróides — desempenham papéis na regulação do desenvolvimento. Esses papéis serão apresentados com algum detalhe nos capítulos e seções dedicados a estes tópicos. Nesta discussão, no entanto, será focalizada a sinalização da auxina como um exemplo dos tipos de mecanismos aos quais esses papéis estão vinculados. Este tópico será discutido com mais detalhes no Capítulo 19.

A sinalização da auxina é essencial para o desenvolvimento de polaridade axial e o desenvolvimento do tecido vascular. Há muito, a auxina é conhecida como o sinal para a iniciação da diferenciação do tecido vascular (ver Capítulo 19), conclusão esta, contudo, baseada amplamente em estudos dos efeitos de auxinas aplicadas e de inibidores do transporte de auxina. Mais recentemente, constatou-se que dois genes de *Arabidopsis* — *GNOM* e *MONOPTEROS* — conhecidos como essenciais para o desenvolvimento de polaridade axial e diferenciação de tecidos durante a embriogênese e o desenvolvimento da planta adulta, estão envolvidos na sinalização da auxina. Conforme apresentado anteriormente, o gene *GNOM* de *Arabidopsis* foi identificado porque os embriões homozigotos para mutações neste gênero não apresentam raízes e cotilédones e não desenvolvem polaridade axial (ver Figura 16.7A) (Mayer e cols., 1993).

O produto do gene GNOM é necessário para corrigir a localização do carreador de efluxo de auxina, proteína PIN1 (Figura 16.29). O *GNOM* codifica um fator de troca do nucleotídeo guanina, um componente da maquinaria celular que estabelece a polaridade da célula. Esta maquinaria e a proteína GNOM em particular são necessárias para a localização correta da proteína PIN1 na extremidade basal das células procambiais durante o estádio globular da embriogênese e subseqüentemente, nas células vasculares por todo o desenvolvimento (Steinmann e cols., 1999; Grebe e cols., 2000).

Conforme já foi visto, mutações no gene *MONOPTEROS* (*MP*) resultam em plântulas sem hipocótilo e raiz, embora elas produzam uma região apical. No entanto, as estruturas apicais nos embriões mutante *mp* não são normais e os tecidos dos cotilédones estão desorganizados (ver Figura 16.7B) (Berleth e Jürgens, 1993). Os embriões de mutantes *mp* primeiro mostram anormalidades no estádio octante; eles não formam um procâmbio na parte inferior do embrião globular, a parte que daria origem ao hipocótilo e a raiz. Mais tarde, forma-se um tecido vascular nos cotilédones, mas os feixes são incorretamente conectados.

O gene *MP* codifica uma proteína relacionada ao fator de transcrição conhecido como **ARF** (**fator de resposta à auxina;** do inglês, *a*uxin *r*esponse *f*actor) (Hardtke e Berleth, 1998). ARF e MONOPTEROS ligam-se aos elementos de resposta à auxina nos promotores de certos genes, que são transcritos na presença de auxina. Aparentemente, o gene *MP* é exigido para a expressão de genes envolvidos na diferenciação de tecidos vasculares.

Outra evidência que reforça a sinalização da auxina durante a embriogênese inclui a descoberta que a putativa proteína receptora de auxina, **ABP1** é necessária para o alongamento e divisão celulares organizados na embriogênese. Mutantes de *Arabidopsis* homozigotos para *abp1* não formam embriões maduros, embora eles se desenvolvam normalmente a partir do estádio globular inicial. Estes mutantes não podem fazer a transição para a simetria bilateral e as células não se alongam (Chen e cols., 2001).

A sinalização da auxina também participa da organogênese a partir do meristema apical do caule e na formação de raízes laterais. Os indivíduos de *Arabidopsis* com mutações no gene *PIN1* carreador de efluxo de auxina desenvolvem uma inflorescência em forma de grampo desprovida de órgãos laterais (Figura 16.30). Nas plantas do tipo selvagem, a expressão do gene *PIN1* é regulada nos estádios iniciais de formação do primórdio, antes que os primórdios comecem a tornar-se protuberantes. Nas mutantes *pin1*, por sua vez o meristema apical do caule na extremidade da inflorescência em grampo tem uma estrutura normal, exceto que não são gerados órgãos na zona periférica e a parte aérea produzida

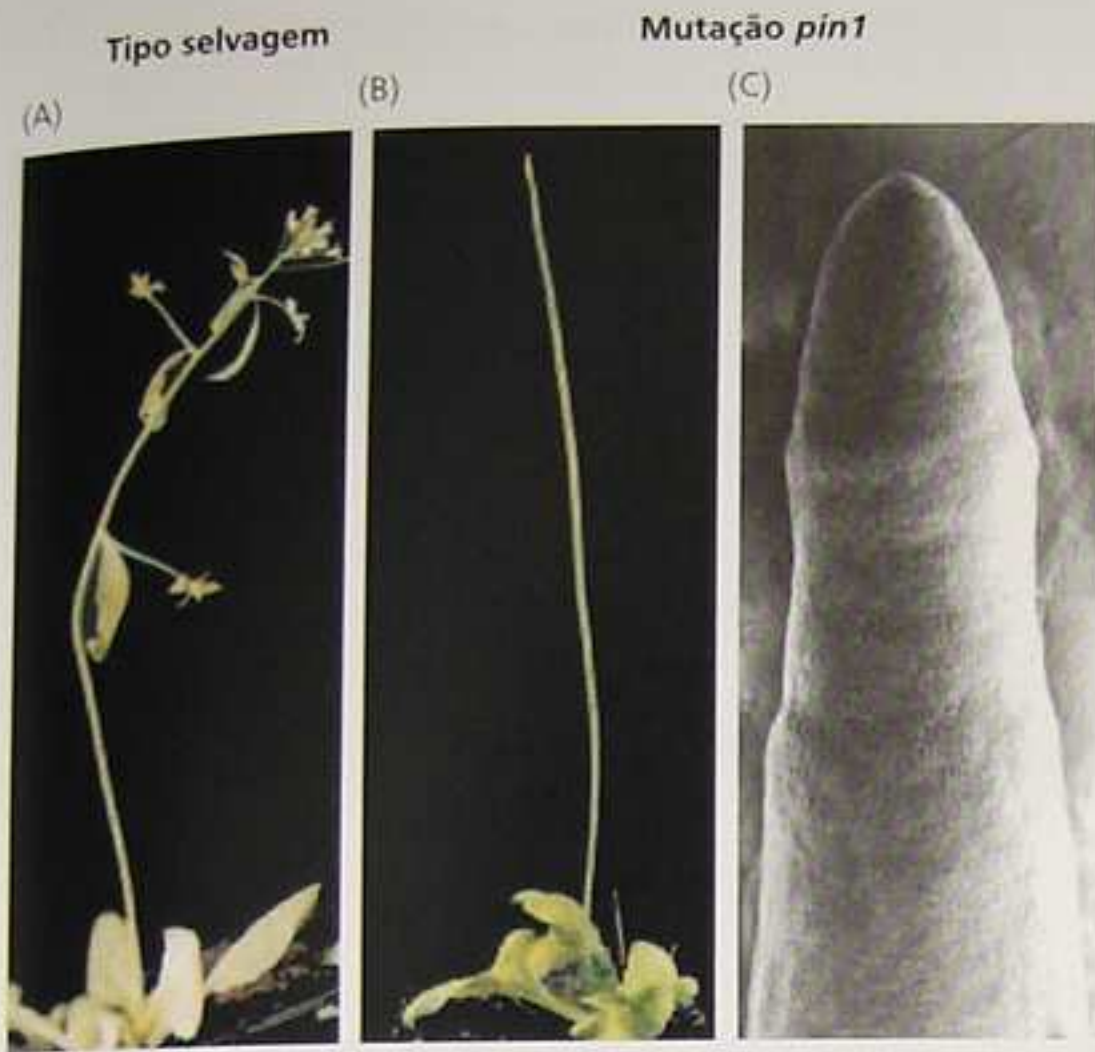



FIGURA 16.30 O gene *PIN1* é essencial para a formação de órgãos laterais a partir do meristema da inflorescência em *Arabidopsis*. (A) No tipo selvagem, o meristema da inflorescência gera um caule portador de folhas e numerosas gemas florais. (B) As plantas com mutações *pin1* produzem um meristema da inflorescência, mas ele não gera órgãos laterais. (C) O meristema da inflorescência produz apenas tecidos axiais, de modo similar ao meristema apical da raiz, conforme mostrado nesta electromicrografia de varredura (Vernoux e cols., 2001).

não apresenta apêndices laterais (Vernoux e cols., 2000). Assim, a auxina provavelmente é exigida para a sinalização de eventos iniciais necessários para a organogênese a partir do meristema apical do caule.

Essa hipótese é sustentada por trabalhos com tomateiro. Quando os meristemas apicais do tomateiro são cultivados em um meio contendo o inibidor do transporte de auxina, ácido *N*-1-naftilftalâmico (NPA), eles continuam a crescer, mas resultam em partes aéreas em forma de grampo desprovidas de apêndices laterais. Quando estes meristemas induzidos por NPA foram tratados com auxina em suas extremidades, a iniciação foliar foi restaurada (Reinhardt e cols., 2000).

Outros mecanismos de sinalização permanecem desconhecidos. Em outros casos, o mecanismo pelo qual as células se comunicam não tem sido estabelecido, embora fique claro que a informação posicional seja trocada entre células em tecidos diferentes. Conforme já apresentado, os genes *SHR* e *SCR* são importantes para o estabelecimento dos padrões radiais de tecidos em raízes, codificando preferencialmente fatores de transcrição similares, mas expressos e funcionando em tecidos diferentes.

O gene *SCR* é exigido para a divisão celular assimétrica, que forma a epiderme e o córtex, e determina também o destino das células da endoderme. O gene *SCR* é expresso na célula-tronco que dará origem ao tecido fundamental, antes de ele se dividir assimetricamente para formar os precursores da endoderme e do córtex ((Figura 16.31A). O gene *SCR* continua a ser expresso na endoderme, após a divisão da célula-tronco (Figura 16.31B).

A expressão do gene *SCR* requer a expressão de *SHR*, mas este último não é expresso nem no córtex nem na endoderme. Em vez disso, *SHR* é expresso no periciclo e no cilindro vascular (Figura 16.31C) (Helariutta e cols., 2000), o que indica que a expressão do gene *SHR* gera um sinal recebido pelas células-tronco do tecido fundamental e causa a expressão do gene *SCR* nas mesmas. Isto ilustra ainda a importância potencial da sinalização célula a célula na determinação do destino celular e no desenvolvimento vegetal. Até o momento, não se sabe como ocorre esta comunicação.

Sinalização via tráfego de proteínas reguladoras e/ou mRNAs. A comunicação simplástica entre células ocorre via conexões de plasmodesmas por meio de suas paredes celulares (ver Capítulo 1). As células vivas de uma planta, na maioria, estão conectadas simplasticamente com suas vizinhas por plasmodesmas que passam pelas paredes celulares contíguas e fornecem algum grau de continuidade entre elas. Existe crescente evidência que os sinais trocados por intermédio de plasmodesmas incluem proteínas reguladoras e mRNAs (Zambryski e Crawford, 2000).

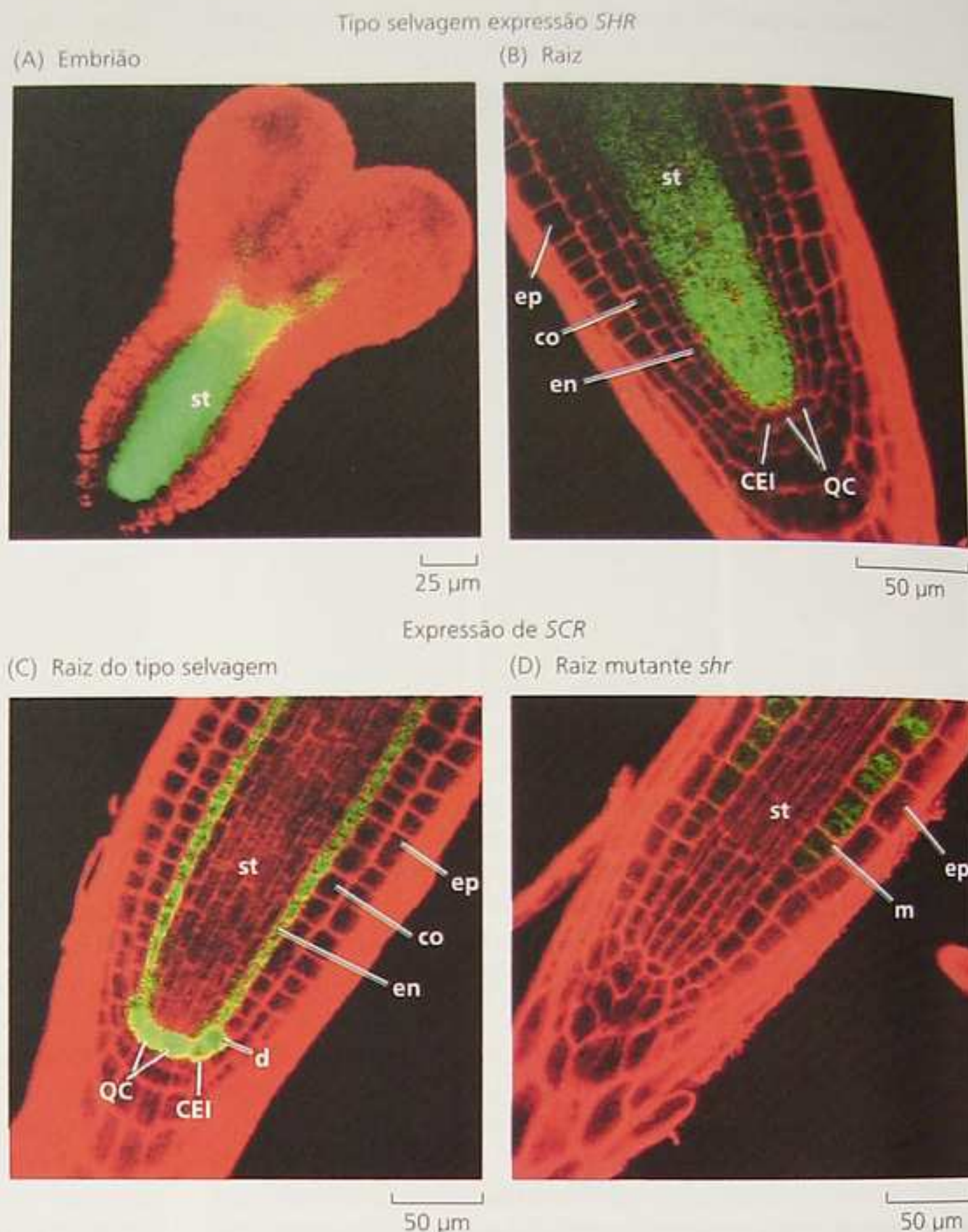
A importância dos plasmodesmas para a comunicação célula a célula durante o desenvolvimento tornou-se aparente com a descoberta que o mRNA do gene *KN1* de identidade do meristema do milho não pode ser detectado na camada L1 do meristema apical do caule vegetativo. O gene *KN1* é expresso apenas em células da camada L2. A proteína KN1, no entanto, é detectada em todas as regiões do meristema apical do caule, incluindo a camada L1. Visto que a proteína KN1 não é sintetizada na camada L1, ela deve ser transportada para esta camada a partir da camada L2, por meio de plasmodesmas (Figura 16.32) (Lucas e cols., 1995).

Em *Antirrhinum*, a expressão do gene *FLO* na camada L1 ativa a expressão dos genes de identidade dos órgãos florais em todas as camadas do meristema (Carpenter e Coen, 1995). Embora sejam possíveis muitas explanações para esta relação, uma delas é que a proteína FLO, ao passar pelos plasmodesmas, move-se para estas outras camadas, a partir das células em que ela é sintetizada.

Os vírus invadem as plantas e se propagam de célula a célula por meio de plasmodesmas. Seus genomas codificam proteínas designadas **proteínas de movimento**, que podem facilitar o movimento do genoma do RNA viral pelos plasmodesmas. É provável que os vírus tenham seqüestrado um mecanismo que evoluiu da comunicação célula a célula. Até o presente, não está claro por que a troca de informação deveria ser organizada desta maneira, mas este tipo de comunicação pode ser um fenômeno geral no desenvolvimento vegetal.

A ANÁLISE DO CRESCIMENTO VEGETAL

Como as plantas crescem? Esta pergunta aparentemente simples tem desafiado botânicos por mais de 150 anos. Novas células formam-se continuamente nos meristemas apicais. As células aumentam lentamente no meristema apical e de modo mais rápido nas regiões subapicais. O aumento de volume celular resultante pode variar até 100 vezes, dependendo da espécie e das condições ambientais. O crescimento vegetal tem sido classicamente analisado em termos de número de células ou tamanho geral (ou massa). No entanto, estas medidas contam apenas parte da história.

FIGURA 16.31 Os genes *SHORTROOT* (*SHR*) e *SCARECROW* (*SCR*) em *Arabidopsis* controlam a padronização dos tecidos durante o desenvolvimento da raiz. As proteínas SHR e SCR foram localizadas por microscopia confocal, após serem tratadas com proteína verde fluorescente (GFP; do inglês, *green fluorescent protein*), que tem uma cor amarelo-esverdeada. (A) Durante a embriogênese no tipo selvagem de *Arabidopsis*, a proteína SHR está localizada nos tecidos pró-vasculares. (B) A proteína SHR continua localizada no cilindro vascular pelo crescimento da raiz primária. (C) Em raízes do tipo selvagem, a proteína SCR está localizada no centro quiescente, endoderme e na célula-tronco cortical-endodérmica (CEI). Ela não está presente no córtex, cilindro vascular ou epiderme. (D) A expressão de *SCR* está marcadamente reduzida na raiz mutante *shr* e agora aparece somente na camada celular mutante que possui características de endoderme e córtex. CEI = célula-tronco cortical-endodérmica; co = córtex; d = células-filhas; en = endoderme; ep = epiderme; m = camada celular mutante; QC = centro quiescente; st = cilindro vascular (Helariutta e cols., 2000).

O crescimento dos tecidos não é nem uniforme nem aleatório. As derivadas dos meristemas apicais expandem-se de maneiras previsíveis e sítio-específicas; os padrões de expansão nestas regiões subapicais determinam amplamente o tamanho e a forma do corpo vegetal primário. O crescimento total da planta pode ser considerado como a soma dos padrões locais de expansão celular.

A análise dos movimentos de células ou dos "elementos de tecidos" (e os problemas relacionados à expansão celular) é denominada *cinemática*. Nesta seção, serão discutidas as definições clássicas de crescimento e a abordagem mais moderna, cinemática. Como se verá, a vantagem da abordagem cinemática é que ela permite matematicamente a descrição dos padrões de crescimento, em termos dos padrões de expansão das suas células constituintes

O crescimento vegetal pode ser medido de maneiras diferentes

O crescimento em plantas é definido como um aumento irreversível de volume. O maior componente do crescimento vegetal é a expansão celular governada pela pressão de turgor. Durante este processo, as células aumentam várias vezes em volume e tornam-se altamente vacuoladas. Todavia, o tamanho é apenas um critério que pode ser usado para medir o crescimento.

Assim, o crescimento pode ser medido, também, em termos de mudança do peso fresco — isto é, o peso do tecido vivo — durante um determinado período. No entanto, o peso fresco de plantas crescendo no solo flutua em resposta às alterações do *status* hídrico, de modo que este critério pode ser um indicador inconsistente do crescimento em andamento. Em tais situações, as medições do peso seco são freqüentemente mais apropriadas.

O número de células é um parâmetro comum e conveniente para medir o crescimento de organismos unicelulares, tais como a alga verde *Chlamydomonas* (Figura 16.33). Em organismos multicelulares, no entanto, o número de células pode ser uma medida enganosa do crescimento, pois as células podem se dividir sem aumentar em volume.

Durante os estádios iniciais da embriogênese, por exemplo, o zigoto subdivide-se em células progressivamente menores, sem um aumento líquido no tamanho do embrião. Somente após ele alcançar o estádio de oito células o aumento em volume começa a refletir o aumento no número de células. Por ser o zigoto uma célula especialmente grande, esta falta de correspondência entre um au-

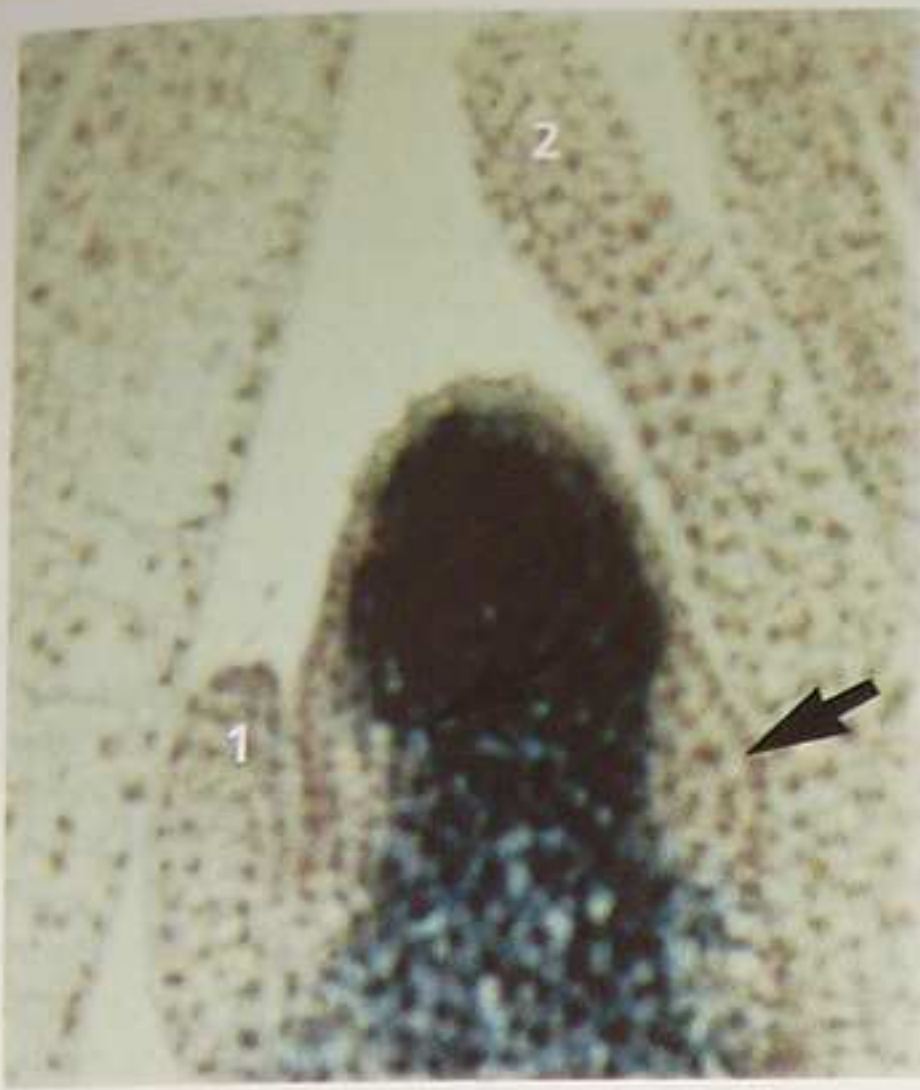



FIGURA 16.32 O gene *KN1* é expresso por todo o meristema apical do caule do milho, mas ele não é expresso na camada L1 ou nos primórdios foliares. O mRNA de *KN1* foi localizado aqui, em uma secção longitudinal através do meristema, por um procedimento de hibridização. A seta aponta para o sítio previsto do próximo primórdio foliar (PO); os números 1 e 2 identificam os primórdios foliares P1 e P2, respectivamente (Jackson e cols., 1994).

mento no número de células e crescimento pode ser incomum, mas ela chama a atenção para o problema potencial em equiparar um aumento no número de células com crescimento.

Embora o número de células possa nem sempre ser uma medida confiável do crescimento vegetal, na maioria dos casos as células em divisão, em particular em meristemas, duplicam em volume durante o seu ciclo celular, razão pela qual um aumento no número de células, como o causado pela atividade dos meristemas apicais, contribui para o crescimento vegetal. No entanto, o componente maior do crescimento vegetal é a expansão celular rápida, que ocorre na região subapical após cessar a divisão celular.

Visto que todas as células do eixo da planta alongam-se sob condições normais, quanto maior o número de células produzidas pelo meristema apical mais longo será o eixo. Por exemplo, quando plantas de *Arabidopsis* são transformadas com um gene que codifica ciclina, um componente-chave da maquinaria reguladora do ciclo celular (ver Capítulo 1), as células do meristema apical progridem mais rapidamente por meio dos seus ciclos celulares, de modo que mais células se formam por unidade de tempo. Como resultado, as raízes destas plantas transgênicas possuem mais células e são substancialmente mais longas do que as raízes de plantas do tipo selvagem crescendo sob condições similares (Doerner e cols., 1996).

Novas células formam-se continuamente nos meristemas apicais. Com cada nova série de divisão celular e expansão celular associada, as derivadas mais velhas são deslocadas a uma pequena distância do ápice. Como as células ficam mais distantes do ápice, a taxa de deslocamento é bastante acelerada. Ao considerar o crescimento vegetal como um processo de deslocamento celular a partir do ápice, pode ser aplicado o princípio da cinemática.

A produção de células pelo meristema é comparável a uma fonte

Fluidos em movimento, como cachoeiras, fontes e ondas de barcos, podem gerar formas específicas. O estudo do movimento de partículas de fluidos e das mudanças de forma que os fluidos experimentam é denominado **cinemática**. As idéias e os métodos numéricos usados para estudar estas formas de fluidos são úteis para a caracterização do crescimento meristemático. Em ambos os casos, é produzida uma forma inalterável, mesmo que ela seja composta de elementos móveis e alteráveis.

Em plantas, um exemplo de uma forma alterável composta de elementos deslocados e em transformação é o gancho plumular de uma dicotiledônea, tal como o feijoeiro comum (Figura 16.34). Como a plântula do feijoeiro emerge da testa da semente, a extremidade apical do hipocótilo se curva, formando um gancho. Considera-se que o gancho protege de dano o ápice da plântula durante o crescimento no solo. Durante o crescimento da plântula (no solo

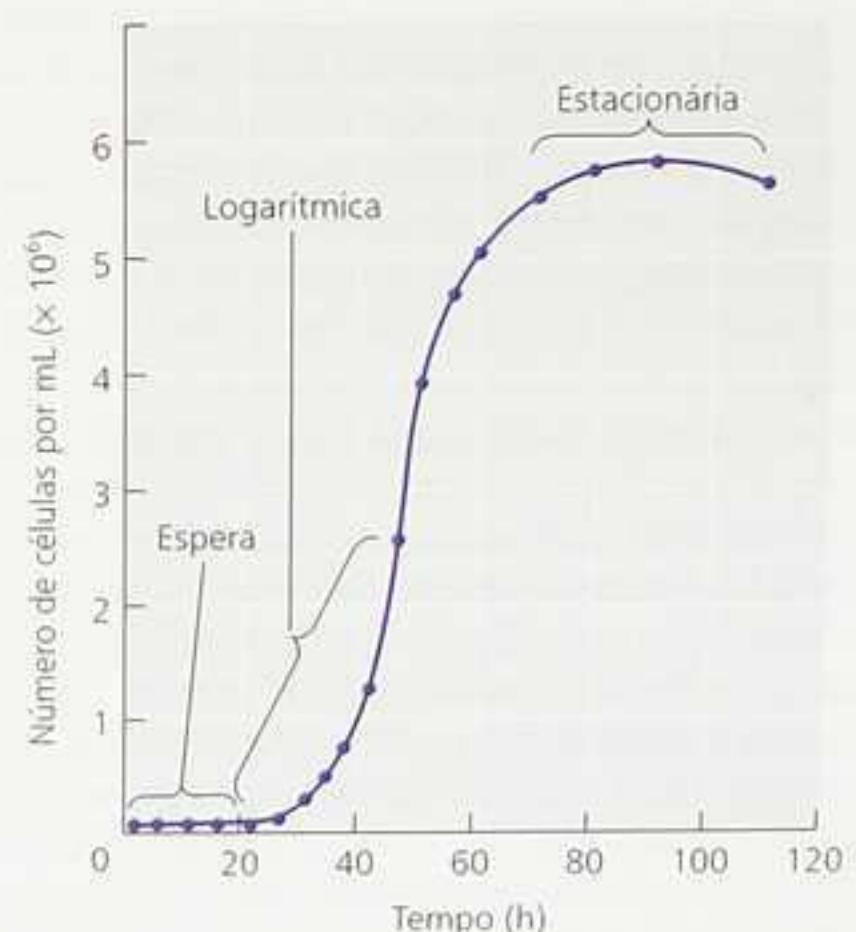



FIGURA 16.33 Crescimento da alga verde unicelular *Chlamydomonas*. O crescimento é quantificado pela contagem do número de células por milímetro, nos períodos de crescimento após as células serem colocadas em meio fresco de crescimento. Temperatura, luz e nutrientes fornecidos são ótimos para o crescimento. Um período de espera inicial, durante o qual as células podem sintetizar enzimas exigidas para o crescimento rápido, é seguido por um período em que o número de células cresce exponencialmente. Este período de crescimento rápido é seguido por um período de crescimento lento, em que o número de células cresce linearmente. A seguir, vem a fase estacionária, na qual o número de células permanece constante ou, mesmo, diminui, pois os nutrientes são esgotados do meio.

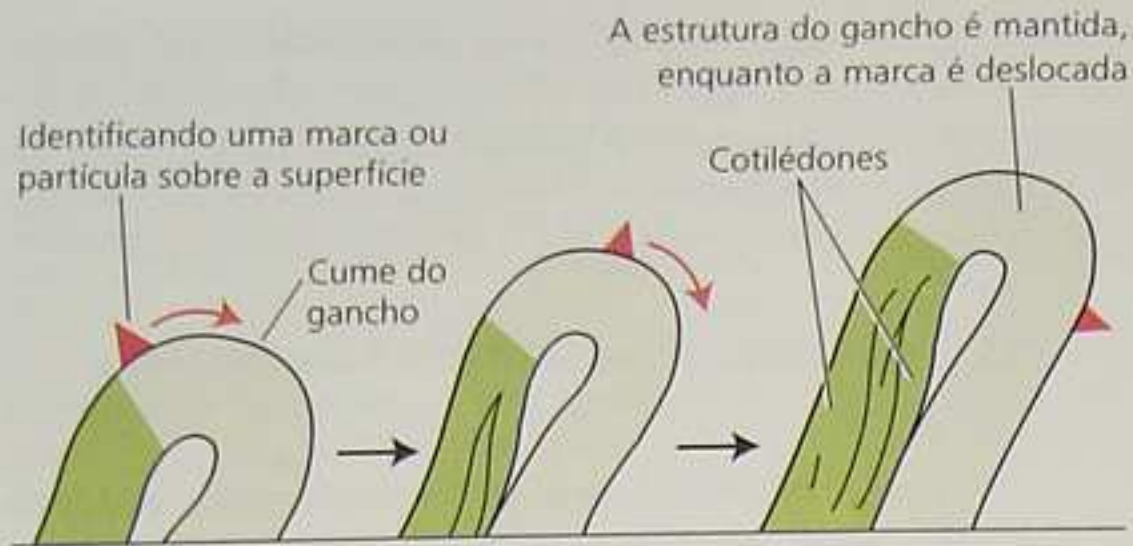



FIGURA 16.34 O gancho plumular de dicotiledôneas é um exemplo de uma forma constante composta de elementos em transformação. A forma de gancho é mantida ao longo do tempo, enquanto tecidos diferentes primeiro se curvam e depois se endireitam, quando são deslocados do ápice da plântula durante o crescimento. Se for feita uma marca em um ponto fixado sobre a superfície, ela será deslocada (indicada pela seta), parecendo fluir pelo gancho ao longo do tempo (Silk, 1994).

ou sob luz difusa), o gancho migra no caule, do hipocótilo para o epicótilo e, depois, para o primeiro e segundo entrenós, mas a sua forma permanece constante.

Se for marcada uma célula epidérmica específica localizada próximo ao ápice da plântula, pode-se observar como ela flui para o gancho plumular e, então, para a região retilínea abaixo deste (ver Figura 16.34). É evidente que a marca não se arrasta sobre a superfície da planta; as células vegetais são unidas e não experimentam muito movimento relativo durante o desenvolvimento. A mudança de posição da marca, relativa ao gancho plumular, implica que este é composto de um percurso de elementos de tecidos, cada um dos quais primeiro se curva e, então, se endireita, na medida em que é deslocado do ápice da planta durante o crescimento. A forma estável é produzida por uma marcha de células em transformação.

A extremidade da raiz é um outro exemplo de uma forma estável composta de elementos de tecidos em transformação. Neste caso, também, a forma mostra-se estável apenas quando a distância é medida a partir da extremidade da raiz. Uma região de divisão celular ocupa talvez 2 mm da extremidade da raiz. A zona de alongamento estende-se por cerca de 10 mm distante da extremidade da raiz. A diferenciação do floema é observada em primeiro lugar, começando a 3 mm da extremidade; os elementos funcionais do xilema podem ser vistos a cerca de 12 mm da extremidade. Uma célula marcada próximo à extremidade parecerá fluir primeiro pela região de divisão celular, depois passa para a zona de alongamento e para a região de diferenciação do xilema, e assim por diante. Esta mudança indica que os elementos de tecidos em desenvolvimento primeiro se dividem e se alongam, para depois se diferenciarem.

De modo análogo, o caule porta uma sucessão de folhas em estádios de desenvolvimento diferentes. Durante um período de 24 horas, uma folha pode atingir o tamanho, a forma e a composição bioquímica que a sua vizinha teve no dia anterior. Assim, a forma do caule é também produzida por uma marcha de elementos em transformação, que pode ser analisada pela cinemática. Tal análise não é meramente descritiva; ela permite cálculos do crescimento e taxas biossintéticas de elementos individuais de tecidos (células) dentro de uma estrutura dinâmica.

Os elementos de tecidos são deslocados durante a expansão

Como já foi visto, o crescimento em caules e raízes está localizado em regiões junto às extremidades desses órgãos. As regiões com tecidos em expansão são chamadas de **zonas de crescimento**. Com o tempo, os meristemas movem-se em sentido oposto à base da planta, pelo crescimento das células na zona de crescimento.

Se forem feitas marcas sucessivas sobre o caule ou a raiz, a distância entre as marcas se alterará, dependendo de onde elas estão dentro da zona de crescimento. Além disso, todas essas marcas se moverão em sentido oposto à extremidade da raiz ou do caule, mas as taxas de movimento dependerão das suas distâncias em relação à extremidade.

Segundo outra perspectiva, se for observada a extremidade de uma raiz que teve marcas feitas em intervalos ao longo do eixo, seria verificado que, com o tempo, todas as marcas se moveriam para mais distante de quem olha. A razão é que regiões distintas do eixo da planta experimentam deslocamento e expansão durante o crescimento e o desenvolvimento.

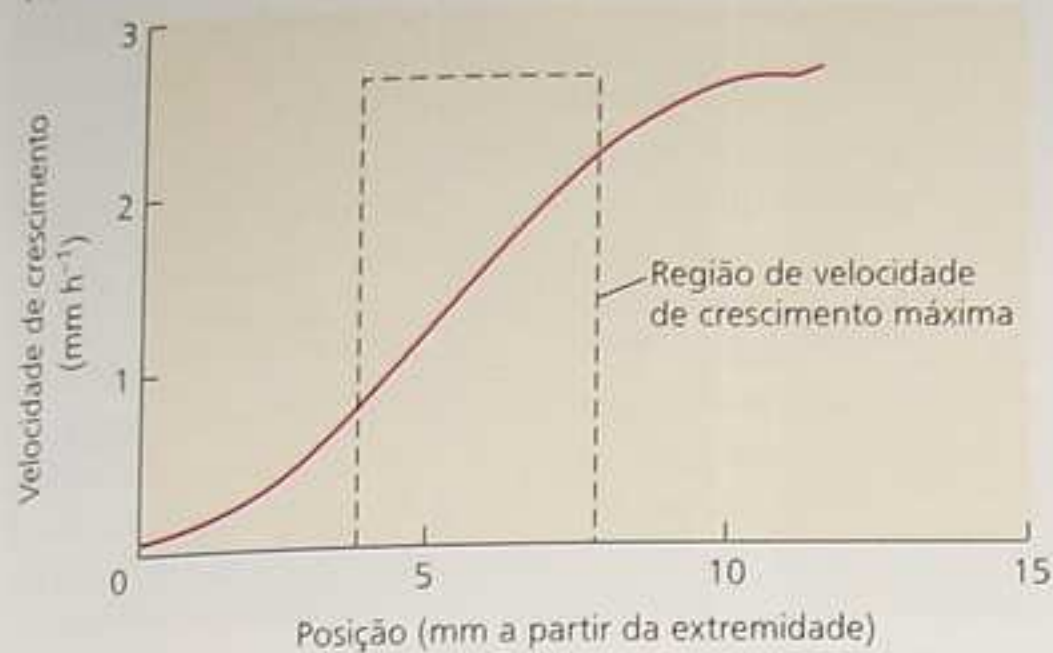
Como as regiões se movem em sentido oposto ao ápice, sua taxa de crescimento aumenta

Como um determinada região do eixo da planta move-se em sentido oposto ao ápice, sua velocidade de crescimento aumenta (a taxa de alongamento se acelera), até que seja alcançada uma velocidade limite constante igual à taxa geral de extensão do órgão. A razão deste aumento da velocidade de crescimento é que, com o tempo, progressivamente mais tecido é posicionado entre a partícula em movimento e o ápice; além disso, sucessivamente mais células estão se expandindo, de modo que a partícula é deslocada mais e mais rapidamente. Em uma raiz de milho de crescimento rápido, um elemento de tecido consome cerca de oito horas para se mover de 2 mm (extremidade da zona meristemática) a 12 mm (extremidade da zona de alongamento).

Além da zona de crescimento, os elementos não se separam; elementos vizinhos têm a mesma velocidade (expressa como a mudança em distância a partir da extremidade, por unidade de tempo), e a taxa à qual as partículas são deslocadas a partir da extremidade é a mesma à qual a extremidade se move pelo solo. A extremidade da raiz de milho é impulsionada no solo a 3 mm h^{-1}. Esta é também a taxa à qual a região que não está crescendo recua a partir do ápice e ela é igual ao declive final da trajetória do crescimento.

O perfil da velocidade de crescimento é uma descrição espacial do crescimento

As velocidades de diferentes elementos de tecidos são cotejadas com a sua distância em relação ao ápice, para fornecer o padrão espacial de velocidade de crescimento ou **perfil da velocidade de crescimento** (Figura 16.35A). A velocidade de crescimento cresce com a posição na zona de crescimento. Um valor constante é obtido junto à base da zona de crescimento. A veloci-

(A) Perfil da velocidade de crescimento

(B) Taxa de crescimento elementar relativa

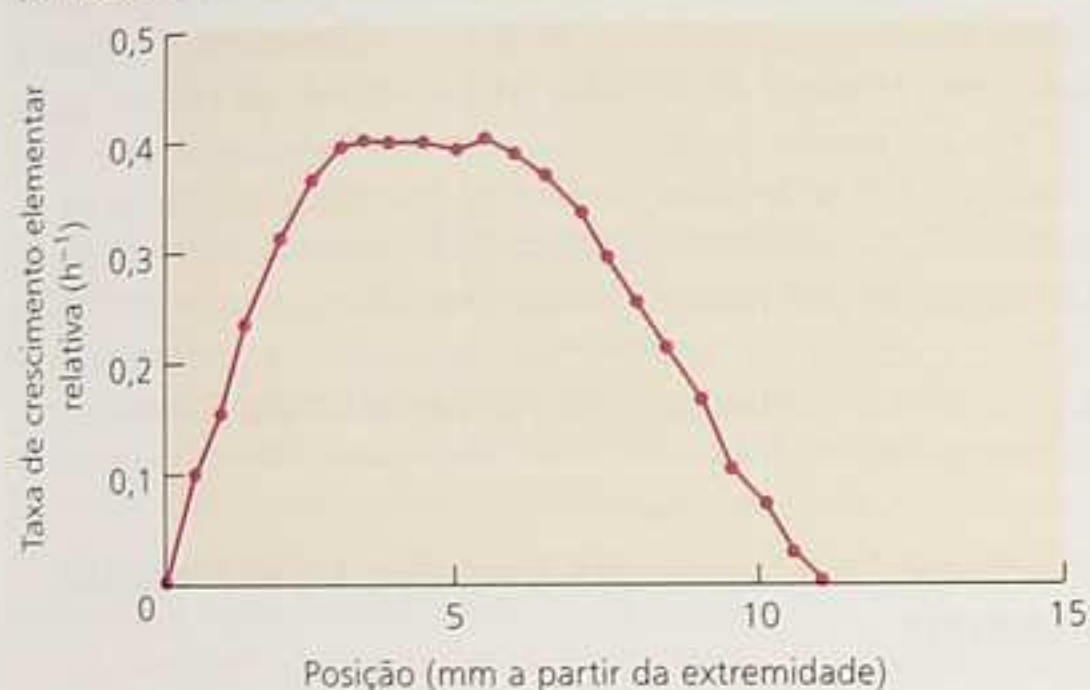



FIGURA 16.35 O crescimento da raiz primária do milho (*Zea mays*) pode ser representado cinematicamente por duas curvas de crescimento relacionadas. (A) O perfil da velocidade de crescimento plota a velocidade de movimento em sentido oposto à extremidade de pontos a distâncias diferentes em relação a ela. Isto nos mostra que a velocidade de crescimento aumenta com a distância a partir da extremidade, até que alcance uma velocidade uniforme igual à taxa de alongamento da raiz. (B) A taxa de crescimento elementar relativa nos mostra a taxa de expansão de qualquer ponto particular na raiz. Ela é a medida mais útil para o fisiologista, pois ela nos indica onde estão localizadas as regiões com expansão mais rápida (Silk, 1994).

dade final de crescimento é o declive final e constante da trajetória de crescimento igual à taxa de alongamento do órgão, conforme discutido na seção anterior. Na raiz de milho em crescimento rápido, a velocidade de crescimento é de 1 mm h^{-1} a 4 mm e alcança seu valor final de quase 3 mm h^{-1} a 12 mm.

Se a velocidade de crescimento é conhecida, pode ser calculada a **taxa relativa de crescimento elementar,** que representa a mudança fracionária em comprimento por unidade de tempo (ver **Tópico 16.4 na Internet**). Esta taxa relativa de crescimento elementar mostra a localização e a magnitude da taxa de extensão e pode ser usada para quantificar os efeitos da variação ambiental sobre o padrão de crescimento (Figura 16.35B).

SENESCÊNCIA E MORTE CELULAR PROGRAMADA

No outono, as pessoas que vivem em regiões temperadas podem apreciar as bonitas mudanças de cores que precedem a perda de folhas das árvores decíduas. As folhas mudam de cor porque as alterações no comprimento do dia e as temperaturas baixas desencadeiam processos de desenvolvimento que levam à senescência e à morte foliar. A senescência é diferente de necrose, embora ambas levem à morte. A **necrose** é a morte provocada por dano físico, venenos ou outra lesão externa. A **senescência,** ao contrário, é um processo de desenvolvimento normal, dependente de energia, controlado pelo próprio programa genético da planta. As folhas são geneticamente programadas para morrer e sua senescência pode ser iniciada por fatores ambientais.

Como as folhas novas são iniciadas a partir do meristema apical do caule, as folhas mais velhas freqüentemente ficam à sombra e perdem sua capacidade de funcionar eficientemente na fotossíntese. A senescência recupera uma porção dos recursos valiosos que a planta investiu na formação das folhas. Durante a senescência, enzimas hidrolíticas decompõem muitas proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos. Os açúcares, nucleosídeos e aminoácidos componentes são, então, transportados de volta para a planta via floema, onde serão reutilizados em processos de síntese. Muitos minerais também são transportados para fora de órgãos senescentes e retornam para o corpo principal da planta.

A senescência de órgãos vegetais freqüentemente está associada à **abscisão**, um processo pelo qual células específicas no pecíolo se diferenciam, formando uma camada de abscisão e permitindo ao órgão senescente a separação da planta. No Capítulo 22, será abordado mais a respeito do controle da abscisão pelo etileno.

Nesta seção, serão examinados os papéis que a senescência e a morte celular programada desempenham no desenvolvimento vegetal, observando-se que existem muitos tipos de senescência, cada um com seu programa genético próprio. Depois, nos Capítulos 21 e 22, será descrito como as citocininas e o etileno podem atuar como agentes de sinalização que regulam a senescência vegetal.

As plantas exibem vários tipos de senescência

A senescência ocorre em uma variedade de órgãos e em resposta a muitos fatores diferentes. Muitas plantas anuais, incluindo as principais culturas vegetais como a trigo, o milho e a soja, amarelam abruptamente e morrem após a produção dos frutos, mesmo sob condições ótimas de crescimento. A senescência da planta inteira após um ciclo reprodutivo único é denominada **senescência monocárpica** (Figura 16.36).

Outros tipos de senescência incluem:

- Senescência de caules aéreos em perenes herbáceas.
- Senescência foliar sazonal (como em árvores decíduas).
- Senescência foliar seqüencial (em que as folhas morrem quando alcançam uma certa idade).
- Senescência (amadurecimento) de frutos carnosos; senescência de frutos secos.
- Senescência de cotilédones de reserva e órgãos florais (Figura 16.37).

FIGURA 16.36 Senescência monocárpica na soja (*Glycine max*). A planta à esquerda sofreu senescência, após florescer e produzir frutos (legumes). A planta à direita permaneceu verde e vegetativa porque suas flores foram removidas continuamente (cedida por L. Noodén).

- Senescência de tipos celulares especializados (p. ex., tricomas, traqueídes e elementos de vaso).

Os desencadeadores dos vários tipos de senescência são diferentes e podem ser internos, como uma senescência monocárpica, ou externos, como o comprimento do dia e a temperatura na senescência outonal de árvores decíduas. Independente do estímulo inicial, os diferentes padrões de senescência podem compartilhar programas internos comuns, em que um gene regulador de senescência inicia uma cascata de expressão gênica secundária que, por fim, causa senescência e morte.

A senescência é uma série ordenada de eventos citológicos e bioquímicos

Por ser codificada geneticamente, a senescência segue um curso previsível de eventos celulares. Em nível citológico, algumas organelas são destruídas e outras permanecem ativas. O cloroplasto é a primeira organela a se deteriorar no início da senescência foliar, com a destruição de componentes protéicos dos tilacóides e de enzimas do estroma.

Ao contrário da deterioração rápida de cloroplastos, os núcleos permanecem estrutural e funcionalmente intactos, até os estádios tardios da senescência. Os tecidos senescentes realizam processos catabólicos que exigem a síntese *de novo* de várias enzimas hidrolíticas, tais como proteases, nucleases, lipases e enzimas degradadoras de clorofila. A síntese destas enzimas específicas da senescência envolve a ativação de genes específicos.

Não é surpresa que os níveis da maioria dos mRNAs foliares caia significativamente durante a fase de senescência, mas a abundância de certos transcritos específicos de mRNA aumenta. Os genes cuja expressão decresce durante a senescência são denominados **genes de senescência regulados para baixo (SDGs;** do inglês, *senescence down-regulated genes*). Os SDGs incluem genes que codificam proteínas envolvidas na fotossíntese. No entanto, a senescência envolve muito mais do que a simples interrupção de genes da fotossíntese.

Os genes cuja expressão é induzida durante a senescência são chamados de **genes associados à senescência (SAGs;** do inglês, *senescence-associated genes*). Os SAGs incluem genes que codificam enzimas hidrolíticas, tais como proteases, ribonucleases e lipases, assim como enzimas envolvidas na biossíntese de etileno, como ACC sintase (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) e ACC oxidase. Os SAGs de outra classe têm funções secundárias na senescência. Eles codificam enzimas envolvidas na conversão ou remobilização de produtos de decomposição, tais como glutamina sintetase, que catalisa a conversão de amônio a glutamina (ver Capítulo 12) e é responsável pela reciclagem de nitrogênio de tecidos senescentes.

A morte celular programada é um tipo especializado de senescência

A senescência pode ocorrer na planta completa, como na senescência monocárpica; tanto no órgão, como na senescência foliar; tanto em nível celular quanto na diferenciação de elemento traqueal. O processo pelo qual as células individuais ativam um programa de senescência intrínseco é denominado **morte celular programada (PCD;** do inglês, *programmed cell death*). A PCD é uma parte importante no desenvolvimento animal, no qual o mecanismo molecular tem sido extensivamente estudado. A PCD pode ser iniciada por sinais específicos, tais como erros na replicação do DNA durante a divisão, e envolve a expressão de um conjunto de genes característico. A expressão desses genes resulta em morte celular. Muito pouco é conhecido sobre PCD em plantas (Pennell e Lamb, 1997).

A PCD em animais é geralmente acompanhada por um conjunto distinto de alterações morfológicas e bioquímicas denominado **apoptose** (do grego, significando "caindo", como as folhas no outono). Durante a apoptose, o núcleo se condensa e o DNA nuclear se fragmenta em um padrão específico causado pela degradação do DNA entre nucleossomos (ver **Capítulo 2 na Internet**).

Algumas células vegetais, particularmente em tecidos senescentes, exibem mudanças citológicas similares. A PCD também parece ocorrer na diferenciação dos elementos traqueais, durante a qual os núcleos e a cromatina se degradam e o citoplasma desaparece. Tais alterações resultam da ativação de genes que codificam nucleases e proteases.

Uma função importante da PCD em plantas é a proteção contra organismos patogênicos. Quando um organismo patogênico infecta uma planta, os sinais do patógeno fazem com que as células vegetais, no sítio da infecção, acumulem concentrações al-

FIGURA 16.37 Estádios da senescência da flor de ipoméia (*Ipomoea acuminata*) (cedida por S. L. Taiz).

tas de compostos fenólicos e morram. As células mortas formam uma ilha circular pequena de morte celular denominada **lesão necrótica.**

A lesão necrótica isola e impede a expansão da infecção para os tecidos vizinhos saudáveis, circundando o patógeno com um ambiente tóxico e esgotado nutricionalmente. Esta morte celular rápida e localizada devido ao ataque do patógeno é denominada **resposta de hipersensibilidade** (ver Capítulo 13).

A existência de mutantes de *Arabidopsis* que podem mimetizar o efeito da infecção e desencadear uma cascata completa de eventos, levando à formação de lesões necróticas, mesmo na ausência do patógeno, demostrou que a resposta de hipersensibilidade é um processo geneticamente programado em vez de uma necrose simples.

RESUMO

O plano básico do corpo da planta madura é estabelecido durante a embriogênese; neste processo, os tecidos são organizados radialmente: uma camada epidérmica externa circundando um cilindro de tecido vascular que está localizado dentro do tecido cortical ou fundamental. Este padrão axial apical-basal da planta madura, com eixos polares da raiz e do caule, também é estabelecido durante a embriogênese, como o são os meristemas primários que gerarão a planta adulta.

Um tipo comum de desenvolvimento embrionário em angiospermas, exemplificado por *Arabidopsis thaliana*, é caracterizado por padrões definidos de divisões celulares, formando estádios sucessivos: os estádios globular, de coração, torpedo e de maturação. O padrão axial do corpo é estabelecido durante a primeira divisão do zigoto e os genes mutantes eliminam parte do embrião. O padrão radial de tecidos é estabelecido durante o estádio globular, aparentemente como resultado da expressão de genes que controlam a identidade celular. O gene *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) é expresso na região que dá origem ao meristema apical do caule durante o estádio de coração da embriogênese e sua expressão continuada suprime a diferenciação das células do meristema apical do caule. O gene *GNOM* é exigido para o estabelecimento da polaridade axial e o gene *MONOPTEROS* para a formação da raiz primária embrionária, bem como o desenvolvimento vascular.

Presentemente, não é possível uma explanação completa dos mecanismos responsáveis pelo estabelecimento e manutenção desses padrões, mas existe evidência que uma associação de microtúbulos e microfilamentos, conhecida como a faixa pré-profásica, é importante na determinação do plano de divisão celular. A diferenciação das células não depende da linhagem celular; no entanto, a divisão da célula-tronco é essencial para este processo. A expressão do gene *SCR* (*SCARECROW*), que foi clonado e codifica uma proteína nova, é necessário para a divisão da célula-tronco e o gene *SHR* (*SHORTROOT*) precisa ser expresso para o estabelecimento da identidade celular endodérmica.

Os meristemas são populações de células pequenas e isodiamétricas, que têm características "embrionárias". Os meristemas vegetativos geram porções específicas do corpo da planta e eles se auto-regeneram. Em muitas plantas, os meristemas apicais da raiz e do caule são capazes de crescimento indefinido.

O meristema apical vegetativo do caule gera órgãos laterais (folhas e gemas laterais), assim como segmentos do caule. Em angiospermas, os meristemas apicais caulinares são tipicamente organizados em três camadas distintas, designadas L1, L2 e L3.

Os meristemas apicais da raiz e do caule são primários, formados durante a embriogênese. Os meristemas secundários são iniciados durante o desenvolvimento pós-embrionário e incluem o câmbio vascular, felogênio, meristemas axilares e meristemas secundários das raízes.

A atividade repetitiva do meristema apical vegetativo do caule gera uma sucessão de unidades de desenvolvimento, denominadas fitômeros, cada qual consistindo de uma ou mais folhas, o nó, o entrenó e uma ou mais gemas axilares. O meristema apical vegetativo do caule apresenta atividade indeterminada, na medida em que pode funcionar indefinidamente, mas ele dá origem aos primórdios foliares, que têm crescimento determinado.

As folhas formam-se em um padrão característico, com três estádios: (1) organogênese, (2) desenvolvimento de domínios de subórgãos, (3) diferenciação de células e tecidos. O número e a ordem em que os primórdios foliares se formam são refletidos na filotaxia subseqüente (alternada, oposta, decussada, verticilada ou

espiralada). Os primórdios foliares devem estar posicionados como um resultado da regulação espacial exata de divisão celular dentro do ápice, mas os fatores que controlam esta atividade não são conhecidos.

As raízes crescem a partir das suas extremidades distais. O meristema apical da raiz é subterminal e coberto pela coifa. As divisões celulares no ápice da raiz geram fileiras de células, que subseqüentemente se alongam e se diferenciam para adquirir função especializada. Quatro zonas de desenvolvimento são reconhecidas na raiz: coifa, zona meristemática, zona de alongamento e zona de maturação. Em *Arabidopsis*, as fileiras de células maduras podem ser acompanhadas como células-tronco dentro da população de células meristemáticas. O meristema apical da raiz de *Arabidopsis* consiste de um centro quiescente, células-tronco cortical-endodérmicas, células-tronco da columela, células-tronco da coifa e epiderme, células-tronco do estelo.

A diferenciação é o processo pelo qual as células adquirem propriedades metabólicas, estruturais e funcionais, distintas daquelas dos seus progenitores. A diferenciação dos elementos traqueais é um exemplo de diferenciação celular vegetal. Os microtúbulos participam da determinação do padrão em que as microfibrilas de celulose são depositadas nas paredes secundárias de elementos traqueais.

Os genes MADS *box* são reguladores-chave de funções biológicas importantes em plantas, animais e fungos. Os genes *homeobox* codificam proteínas homeodomínios que atuam como fatores de transcrição. Esses fatores de transcrição controlam a expressão de outros genes cujos produtos transformam e caracterizam a diferenciação celular.

Na determinação de um destino celular, a posição da célula é mais importante do que a sua linhagem. Destino da célula vegetal é relativamente plástico e pode ser mudado quando são alterados os sinais posicionais necessários para a sua manutenção.

A expressão de genes *homeobox* similares aos genes do milho *KNOTTED* e *SHOOTMERISTEMLESS* é necessária para o caráter indeterminado continuado do meristema apical do caule, mas o gene *WUSCHEL* determina a identidade de células-tronco. A perda de expressão de genes *KNOX* nos primórdios foliares parece ser importante na mudança para o crescimento determinado nestes órgãos.

A posição celular é comunicada via sinalização célula a célula, que pode envolver sinalização induzida por ligante, sinalização hormonal ou tráfego de proteínas reguladoras e/ou mRNAs por meio de plasmodesmas. As moléculas cujo tamanho chega até cerca de 1,6 nm (700-1000 Da) podem passar de célula a célula, pelos plasmodesmas que conectam células epidérmicas foliares. Em certa extensão, os plasmodesmas são ajustados, de modo que a passagem por eles pode ser regulada e o seu limite de exclusão pelo tamanho pode ser modificado, a fim de permitir a passagem de moléculas muito maiores, como os vírus.

O crescimento em plantas é definido como um aumento irreversível de volume. O crescimento vegetal pode ser analisado quantitativamente pela cinemática, o estudo do movimento de partículas e mudança de forma.

O crescimento vegetal pode ser descrito em termos espacial e material. A descrição espacial enfoca os padrões gerados por todas as células localizadas em posições diferentes nas zonas de crescimento. A análise de material focaliza o destino das células individuais ou elementos de tecidos em vários estádios de desenvolvimento. Uma trajetória de crescimento mostra a distância de um elemento de tecido a partir do ápice ao longo do tempo e é, por isso, uma descrição material de crescimento. A velocidade de crescimento é aquela em que elementos de tecidos são deslocados do ápice. A taxa relativa de crescimento elementar é uma medida do aumento fracional em comprimento do eixo por unidade de tempo e representa a magnitude de crescimento em um local particular.

A senescência e a morte celular programada são aspectos essenciais do desenvolvimento vegetal. As plantas exibem uma variedade de diferentes fenômenos de senescência. As folhas são programadas geneticamente para senescer e morrer. A senescência é um processo ativo de desenvolvimento, controlado pelo programa genético da planta e iniciado por fatores ambientais e de desenvolvimento específicos.

A senescência é uma série ordenada de eventos citológicos e bioquímicos. A expressão da maioria dos genes é reduzida durante a senescência, mas a expressão de alguns genes (genes associados à senescência ou SAGs) é iniciada. Os genes recentemente ativos codificam várias enzimas hidrolíticas, tais como proteases, ribonucleases, lipases e enzimas envolvidas na biossíntese de etileno, que realizam os processos degradativos como a morte dos tecidos.

A morte celular programada (PCD) é um tipo especializado de senescência. Uma função importante da PCD nas plantas é a proteção contra organismos patogênicos, a chamada resposta de hipersensibilidade, que foi demonstrada como um processo programado geneticamente.

Material da Internet

Tópicos da Internet

16.1 Polaridade de zigotos de *Fucus*
Uma ampla variedade de gradientes externos pode polarizar o crescimento de células que são inicialmente apolares.

16.2 A faixa pré-profásica de microtúbulos
Os estudos ultra-estruturais têm elucidado a estrutura da faixa pré-profásica de microtúbulos e seu papel na orientação do plano de divisão celular

16.3 Desenvolvimento da raiz de *Azolla*
Os estudos anatômicos da raiz da pteridófita aquática, *Azolla*, fornecem conhecimentos sobre o destino celular durante o desenvolvimento radicular.

16.4 A taxa de crescimento elementar relativa
A taxa de crescimento elementar relativa em vários pontos ao longo de uma raiz pode ser avaliada pela diferenciação da velocidade de crescimento com relação à posição.

Ensaios da Internet

16.1 Meristemas vegetais: uma visão geral histórica
Os cientistas têm usado muitas abordagens para desvendar o segredo de meristemas vegetais.

16.2 O copo de vinho das sereias
A alga marinha verde gigante, *Acetabularia acetabulum*, detém uma posição clássica na história da biologia.

16.3 Determinação do plano de divisão em células vegetais
As células vegetais parecem utilizar mecanismos diferentes daqueles usados por outros eucariontes para controlar seus planos de divisão.

Referências bibliográficas

Assaad, F., Mayer, U., Warner, G., and Jurgens, 6.1996. The KEULE gene is involved in cytokinesis in *Arabidopsis. Mol. Gen. Genet.* 253: 267-277.

Berleth, T., and Jiirgens, G. (1993) The role of the *MONOPTEROS* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis embryo. Development* 118: 575-587.

Bowman, J. L., and Eshed, Y. (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant* Sci. 5: 110-115.

Brand, U., Fletcher, J. C., Hobo, M., Meyerowitz, E. M., and Simon, R. (2000) Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by *CLV3* activity. *Science* 289: 617-619.

Byrne, M. E., Barley, R., Curtis, M., Arroyo, J. M., Dunham, M., Hudson, A., and Martienssen, R. (2000) Asymmetric leaves mediates leaf patterning and stem cell function in *Arabidopsis. Nature* 408: 967-971.

Carpenter, R., and Coen, E. S. (1995) Transposon induced chimeras show that floricaula, a meristem identity gene, acts nonautonomously between cell layers. *Development* 121: 19-26.

Chen, J. -G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R., and Jones, A. M. (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 15: 902-911.

Christensen, D., and Weigel, D. (1998) Plant development: The making of a leaf. *Curr. Biol.* 8: 8643-645.

Clark, S. E. (2001) Cell signaling at the shoot meristem. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:276-284.

Clark, S. E., Running, M. P., and Meyerowitz, E. M. (1993) *CLAVATAI*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis. Development* 119: 397-418.

Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J. E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M. G., Fledman, K. A., and Benfey, P. N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-133.

Doebley J., and Lukens, L. (1998) Transcriptional regulators and the evolution of plant form. *Plant Cell* 10: 1075-1082.

Doerner, P., Jorgensen, J.-E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C. (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380: 520-523.

Fletcher, J. C., and Meyerowitz, E. M. (2000) Cell signaling within the shoot meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 23-30.

Fletcher, J. C., Brand, U., Running, M. P., Simon, R., and Meyerowitz, E. M. (1999) Signaling of cell fate decisions by *CLAVATA3* in *Arabidopsis* shoot meristems. *Science* 283: 1911-1914.

Fukuda, H. (1996) Xylogenesis: Initiation, progression and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299-325.

Grebe, M., Gadea, G., Steinmann, T., Kientz, M., Rahfeld, J.-U., Salchert, K., Koncz, C., and JUrgens, G. (2000) A conserved domain of the *Arabidopsis* GNOM protein mediates subunit interaction and cyclophilin 5 binding. *Plant Cell* 12:343-356.

Hake, S., Vollbrecht, E., and Freeling, M. (1989) Cloning *KNOTTED*, the dominant morphological mutant in maize using Ds2 as a transposon tag. *EMBO J.* 8:15-22.

Hardham, A. R., and Gunning, B. E. S. (1979) Interpolation of microtubules into cortical arrays during cell elongation and differentiation in roots of *Azolla pinnata. J. Cell Sci.* 37: 411-142.

Hardham, A. R., and Gunning, B. E. S. (1980) Some effects of colchicine on microtubules and cell division of *Azolla pinnata. Protoplasma* 102: 31-51.

Hardtke, C., and Berleth, T. (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 17: 1405-1411.

Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Sena, G., Hauser, M.-T., and Benfey, P. N. (2000) The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 10: 555-567.

Hepler, P. K. (1981) Morphogenesis of tracheary elements and guard cells. In *Cytomorphogenesis in Plants*, O. Kiermayer, ed., Springer, Berlin, pp. 327-347.

Jackson, D., Veit, B., and Hake, S. (1994) Expression of maize KNOTTED) related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. *Development* 120: 405-113.

Laux, T., Mayer, Klaus, F. X., Berger, J., and Jiirgens, G. (1996) The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis. Development* 122: 87-96.

Lincoln, C., Long, J., Yamaguchi, J., Serikawa, K., and Hake, S. (1994) *Aknottedl-like homeobox* gene in *Arabidopsis* is expressed in the vegetative meristem and dramatically alters leaf morphology when overexpressed in transgenic plants. *Plant Cell* 6:1859-1876.

Long, J. A., Moan, E. L, Medford, J. I., and Barton, M. K. (1996) A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of *Arabidopsis. Nature* 379: 66-69.

Lotan, T., Ohto, M.-A., Yee, K. M., West, M. A., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fisher, R. L., and Goldberg, R. B. (1998) *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON)* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93: 1195-1205.

Lucas, W. J., Bouche-Pillon, S., Jackson, D. P., Nguyen, L., Baker, L., Ding, B., and Hake, S. (1995) Selective trafficking of KNOTTED1 homeodomain protein and its mRNA through plasmodesmata. *Science* 270: 1980-1983.

Lukowitz, W., Mayer, U., and JUrgens, G. (1996) Cytokinesis in the *Arabidopsis* embryo involves the syntaxin-related *KNOLLS* gene product. *Cell* 84: 61-71.

Malamy, J. E. and Benfey, P. N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana. Development* 124: 33-44.

Mayer, U., Buettner, G., and Jiirgens, G. (1993) Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo: Studies on the role of the gnom gene. *Development* 117: 149-162.

Nishimura, A., Tamaoki, M., Sato, Y., and Matsuoka, M. (1999) The expression of tobacco knotted1-type homeobox genes corresponds to regions predicted by the cytohistological zonation model. *Plant* 1. 18: 337-347.

Ori, N., Eshed, Y., Chuck, G., Bowman, J. L., and Hake, S. (2000) Mechanisms that control *knox* gene expression in the *Arabidopsis* shoot. *Development* 127: 5523-5532.

Pennell, R. I. and Lamb, C. (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9:1157-1168.

Przemeck G. K. H., Mattsson, J., Hardtke, C. S., Sung, Z. R., and Berleth T. (1996) Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200: 229-237.

Reinhardt, D., Mandel, T., and Kuhlemeier, C. (2000) Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell* 12:507-518.

Riechmann, J. L., and Meyerowitz, E. M. (1997) MADS domain proteins in plant development. *Biol. Chem.* 378: 1079-1101.

Riechmann, J. L., Herd, J., Martin, G, Reuber, L., Jiang, C. Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J. Z., Ghandelhari, D., Sherman, B. K., and Yu, G.-L. (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290: 2105-2110.

Scheres, B. (2001) Plant cell identity. The role of position and lineage. *Plant Physiol.* 125:112-114.

Scheres, B., Di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.-T., Janmaat, K. Weisbeek, P., and Benfey, P. N. (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53-62.

Schiefelbein, J. W., Masucci, J. D., and Wang, H. (1997) Building a root: The control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* 9:1089-1098.

Shiu, S. H., and Bleecker, A. B. (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10763-10768.

Silk, W. K. (1994) Kinematics and dynamics of primary growth. *Biomimetics* 2:199-213.

Sinha, N. (1999) Leaf development in angiosperms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 419-146.

Capítulo

17 O fitocromo e o controle do desenvolvimento das plantas pela luz

VOCÊ JÁ LEVANTOU UM PEDAÇO DE MADEIRA caído em seu jardim há algumas semanas e reparou que a grama crescendo embaixo dele era mais clara e alongada que o gramado ao seu redor? Isto acontece porque o pedaço de madeira é opaco, mantendo a vegetação que está sob ele no escuro. Plântulas crescendo no escuro possuem uma aparência pálida, são estranhamente altas e afiladas. Esta forma de crescimento, conhecido como **crescimento estiolado**, é drasticamente diferente da aparência mais baixa e verde das plântulas que crescem à luz (Figura 17.1).

Dado o papel-chave da fotossíntese no metabolismo vegetal, podemos ser tentados a atribuir muito desse contraste a diferenças na disponibilidade de energia metabólica gerada pela luz. Entretanto, é necessário muito pouca energia luminosa, ou tempo, para iniciar a transformação do estado estiolado para o verde. Assim, na mudança do crescimento no escuro para o crescimento à luz, esta atua mais como um desencadeador de desenvolvimento do que como uma fonte direta de energia.

Se removêssemos a madeira e expuséssemos a porção pálida de grama à luz, dentro de aproximadamente uma semana ela estaria tão verde quanto o restante da vegetação. Embora não sejam visíveis a olho nu, essas mudanças na realidade iniciam quase imediatamente após a exposição à luz. Por exemplo, dentro de horas após a aplicação de um único *flash* de luz relativamente fraca a um plântula de feijoeiro cultivada no escuro, em laboratório, pode-se medir varias alterações no seu desenvolvimento: há uma redução na taxa de alongamento do caule, o gancho plumular começa a se tornar reto e inicia a síntese de pigmentos característicos das plantas verdes.

A luz agiu como um sinal para induzir uma alteração na forma da plântula: de uma forma que facilita o crescimento abaixo do solo para uma que é melhor adaptada ao crescimento acima do solo. Na ausência de luz, a plântula utiliza principalmente as reservas estocadas na semente para o crescimento estiolado. Entretanto, os espermatófitos, incluindo as gramíneas, não armazenam energia suficiente para manter o crescimento indefinidamente. Elas necessitam da energia luminosa não só como combustível da fotossíntese, mas também para iniciar as alterações de desenvolvimento do crescimento no escuro para crescimento à luz.

(A) Milho cultivado à luz

(B) Milho cultivado no escuro

(C) Feijoeiro cultivado à luz

(D) Feijoeiro cultivado no escuro

FIGURA 17.1 Plântulas de milho (*Zea mays*) (A e B) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) (C e D) cultivadas à luz (A e C) ou no escuro (B e D). Os sintomas de estiolamento no milho, um monocotiledônea, incluem a ausência de esverdeamento, redução no tamanho das folhas, falha no desenrolamento das folhas e alongamento do coleóptilo e mesocótilo. No feijoeiro — uma dicotiledônea —, os sintomas do estiolamento incluem ausência de esverdeamento, tamanho reduzido das folhas, alongamento do hipocótilo e manutenção do gancho plumular (fotos © M. B. Wilkins).

A fotossíntese não pode ser a força motora dessa transformação, pois as clorofilas não estão presentes durante esse período. O completo desestiolamento requer alguma fotossíntese, porém as mudanças rápidas iniciais são induzidas por uma resposta luminosa nitidamente diferente, chamada de **fotomorfogênese** (do latim, significando literalmente "início da forma à luz").

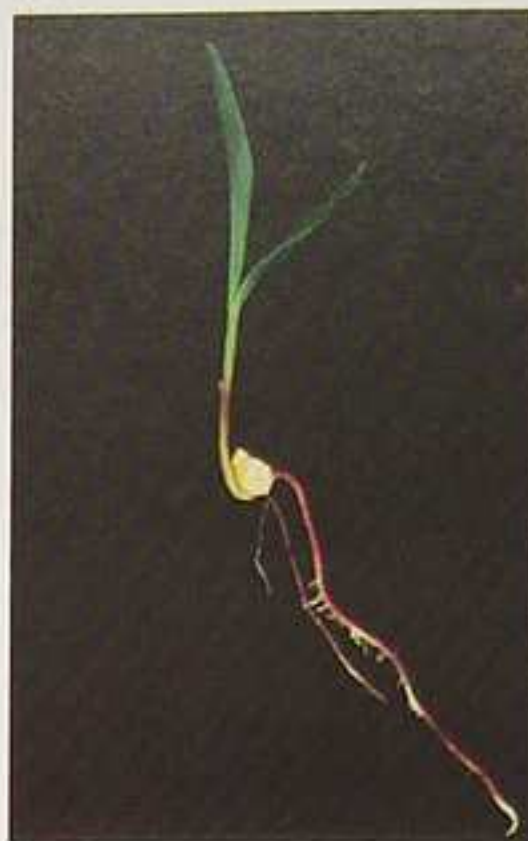
Entre os pigmentos que podem promover as respostas fotomorfogênicas nas plantas, os mais importantes são aqueles que absorvem a luz vermelha e a azul. Os fotorreceptores de luz azul serão discutidos com relação às células-guarda e ao fototropismo no Capítulo 18. O foco deste capítulo é o **fitocromo**, um pigmento protéico que absorve luz mais fortemente nas regiões do vermelho e do vermelho-distante, mas também absorve luz azul. Como será visto neste capítulo e no Capítulo 24, o fitocromo tem um importante papel no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo regulado pela luz.

Inicialmente, será abordada a descoberta do fitocromo e do fenômeno da fotorreversibilidade vermelho/vermelho-distante. A seguir, serão discutidas as propriedades fotoquímicas e bioquímicas do fitocromo, bem como as alterações conformacionais induzidas pela luz. Diferentes tipos de fitocromos são codificados por distintos membros de uma família multigênica, assim como diferentes fitocromos regulam distintos processos na planta. Essas diferentes respostas do fitocromo podem ser classificadas de acordo com a quantidade e a qualidade de luz exigida para produzir o efeito. Finalmente, examinaremos o que é conhecido sobre o mecanismo de ação dos fitocromos em níveis celular e molecular, inclusive as rotas de transdução de sinal e a regulação gênica.

AS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO FITOCROMO

O fitocromo, um pigmento protéico azul com uma massa molecular de aproximadamente 125 kDa (kilodáltons), não foi identificado como uma espécie química diferente até 1959, principalmente por dificuldades técnicas no isolamento e na purificação da proteína. Entretanto, muitas das propriedades biológicas do fitocromo já haviam sido estabelecidas em estudos anteriores com plantas intactas.

As primeiras pistas sobre o papel do fitocromo no desenvolvimento da planta vieram de estudos iniciados na década de 1930 sobre as respostas morfogênicas induzidas pela luz vermelha, em especial a germinação de sementes. A lista destas respostas é hoje enorme e abrange uma ou mais respostas em quase todos os estádios de vida de uma grande variedade de plantas (Tabela 17.1).

Um avanço-chave na história do fitocromo foi a descoberta que os efeitos da *luz vermelha* (650-680 nm) sobre a morfogênese poderiam ser revertidos por uma irradiação subseqüente com luz de comprimentos de onda mais longos (710-740 nm), chamada de *luz vermelho-distante*. Esse fenômeno foi pela primeira vez demonstrado na germinação de sementes, porém foi também observado no crescimento de caules e folhas, bem como na indução floral (ver Capítulo 24).

A observação inicial foi que a germinação das sementes de alface é estimulada pela luz vermelha e inibida pela luz vermelho-distante. Mas a verdadeira descoberta veio muitos anos mais tarde, quando sementes de alface foram expostas a tratamentos alternados de luzes vermelha e vermelho distante. Quase 100% das sementes que receberam luz vermelha como tratamento final germinaram; no entanto, as sementes que receberam luz vermelho distante como tratamento final tiveram a germinação fortemente inibida (Figura 17.2) (Flint 1936).

Duas interpretações foram possíveis para estes resultados. Uma concerne à existência de dois pigmentos, um absorvendo luz vermelha e outro, a luz vermelho-distante, atuando de forma antagônica na regulação da germinação das sementes. Por outro lado, pode ser apenas um pigmento, com possibilidade de existir em duas formas intercoversíveis: uma que absorve a luz vermelha e outra que absorve a luz vermelho distante (Borthwick e cols., 1952).

O modelo escolhido — de um só pigmento — era o mais radical dos dois, pois não havia precedente para tal pigmento fotorre-

TABELA 17.1
Respostas fotorreversíveis típicas, induzidas pelo fitocromo em uma variedade de plantas superiores e inferiores

Grupo	Gênero	Estádio de desenvolvimento	Efeito da luz vermelha
Angiospermas	*Lactuca* (alface)	Semente	Promove germinação
	Avena (aveia)	Plântula (estiolada)	Promove o desestiolamento (p. ex., o desenrolamento foliar)
	Sinapis (mostarda)	Plântula	Promove a formação do primórdio foliar, desenvolvimento das folhas primárias e produção de antocianinas
	Pisum (ervilha)	Adulto	Inibe o alongamento de entrenó
	Xantium (mamona)	Adulto	Inibe o florescimento (resposta fotoperiódica)
Gimnospermas	*Pinus* (pinheiro)	Plântula	Aumenta a taxa de acúmulo de clorofila
Pteridófitos	*Onoclea* (sensitiva)	Gametófito jovem	Promove crescimento
Briófitos	*Polytrichum* (musgo)	Protonema	Promove a replicação dos plastídeos
Clorófitos	*Mougeotia* (alga)	Gametófito maduro	Promove a orientação dos cloroplastos em relação à luz fraca direcional

versível. Vários anos depois, o fitocromo foi demonstrado em extratos vegetais pela primeira vez e suas propriedades fotorreversíveis únicas, exibidas *in vitro*, confirmando a predição (Butler e cols., 1959).

Nesta seção, vamos considerar três tópicos abrangentes:

1. A fotorreversibilidade e seu relacionamento com as respostas do fitocromo
2. A estrutura do fitocromo, sua síntese e montagem, e as mudanças conformacionais associadas com as interconversões das duas formas principais do fitocromo: Pr e Pfr
3. A família de genes do fitocromo, cujos membros têm diferentes funções na fotomorfogênese

O fitocromo pode se interconverter entre as formas Pr e Pfr

Em plantas cultivadas no escuro ou estioladas, o fitocromo está presente na forma que absorve a luz vermelha, referido como **Pr**, pois é sintetizado nessa forma. O Pr, que para o olho humano é azul, é convertido pela luz vermelha para uma forma que absorve a luz vermelho-distante chamada de **Pfr**, o qual é azul-esverdea-

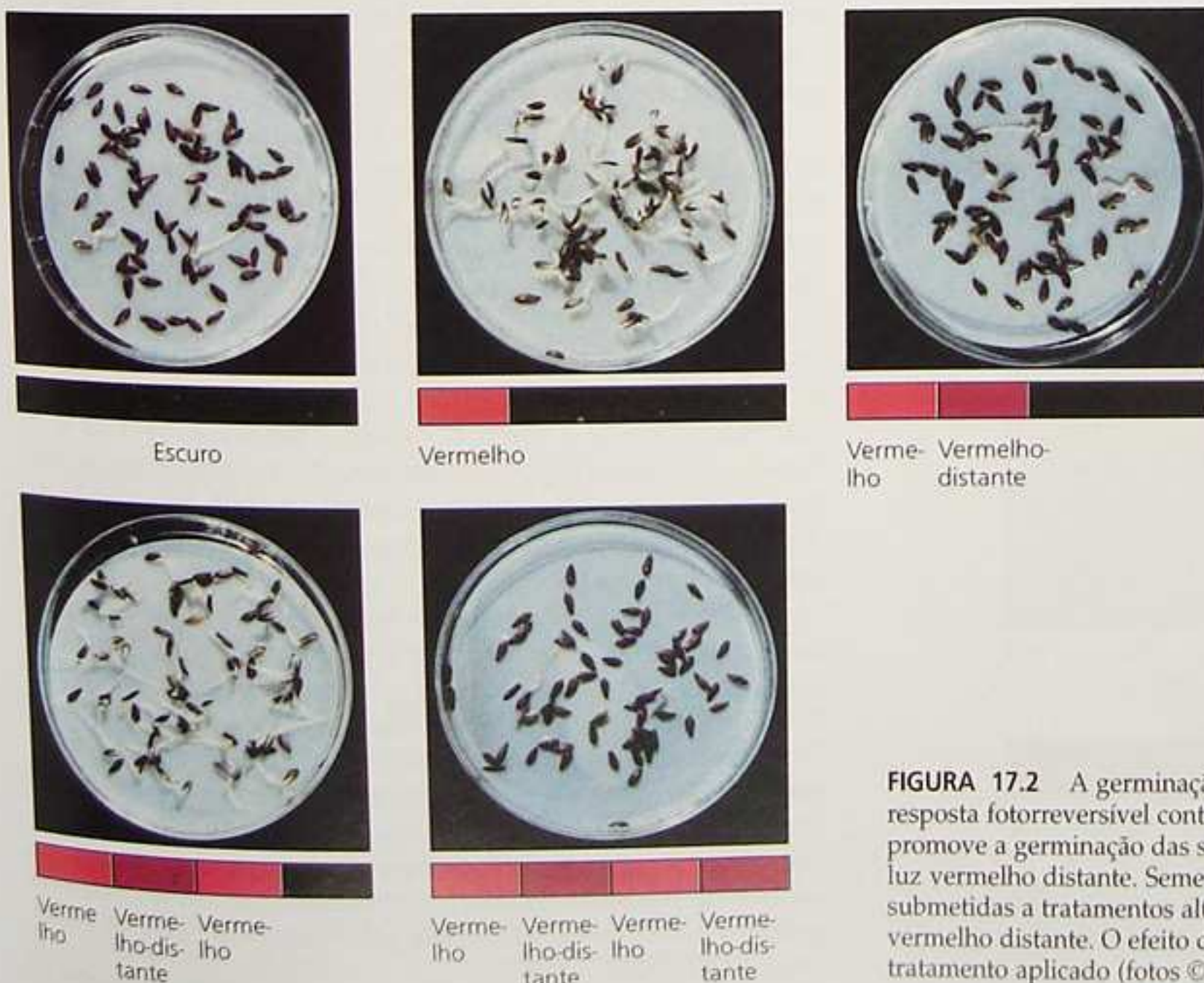
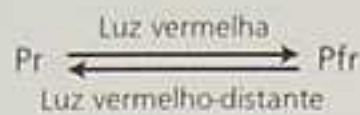



FIGURA 17.2 A germinação de sementes de alface é uma típica resposta fotorreversível controlada pelo fitocromo. A luz vermelha promove a germinação das sementes, porém seu efeito é revertido pela luz vermelho distante. Sementes embebidas (umedecidas) foram submetidas a tratamentos alternados de luz vermelha seguida de vermelho distante. O efeito do tratamento de luz depende do último tratamento aplicado (fotos © M. B.Wilkins).

do. O Pfr, por sua vez, pode ser convertido de volta à Pr pela luz vermelho distante.

Conhecida como **fotorreversibilidade**, esta propriedade de conversão/reconversão é o atributo mais marcante do fitocromo, podendo ser expressa em uma forma abreviada como segue:

$$\text{Pr} \underset{\text{Luz vermelho-distante}}{\overset{\text{Luz vermelha}}{\rightleftarrows}} \text{Pfr}$$

A interconversão das formas Pr e Pfr pode ser medida *in vivo* ou *in vitro*. De fato, muitas das propriedades espectrais de fitocromos cuidadosamente purificados, medidas *in vitro*, são as mesmas *in vivo*.

Quando as moléculas do Pr são expostas à luz vermelha, a maior parte delas absorve esta luz e é convertida a Pfr, porém alguns Pfr também absorvem a luz vermelha e são convertidos de volta a Pr, pois ambos — Pr e Pfr — absorvem a luz vermelha (Figura 17.3). Assim, a proporção de fitocromo na forma Pfr, após saturação com luz vermelha é de apenas, aproximadamente 85%. De modo similar, a pouquíssima quantidade de luz vermelho-distante absorvida pelo Pr não possibilita a conversão completa do Pfr a Pr pela luz vermelho distante de espectro amplo. Em vez disso, é atingido um equilíbrio de 97% Pr e 3% Pfr. Este equilíbrio é denominado **estado fotoestacionário**.

Além da absorção da luz vermelha, ambas as formas do fitocromo absorvem luz na região do azul do espectro (ver Figura 17.3). Por isso, os efeitos podem ser induzidos também pela luz azul, que pode converter Pr a Pfr e vice-versa. As respostas da luz azul podem resultar também da ação de um ou mais fotorreceptores específicos para a luz azul (ver Capítulo 18). O envolvimento do fitocromo em uma resposta a luz azul é geralmente determinado por um teste da capacidade da luz vermelho-distante de reverter a resposta, uma vez que apenas as respostas induzidas pelo fitocromo são revertidas pela luz vermelho distante. Outra forma de discriminar entre fotorreceptores é o estudo de mutantes que sejam deficientes em um dos fotorreceptores.

Intermediários de vida curta do fitocromo. As fotoconversões do Pr a Pfr e do Pfr a Pr não são processos de um único passo. Irradiando o fitocromo com *flashes* de luz de curtíssima duração, é possível observar alterações na absorção que ocorrem em menos de um milissegundo.

Naturalmente, a luz solar é composta por uma mistura de todos os comprimentos de onda do visível. Sob tais condições de luz branca, tanto Pr e Pfr são excitados, e o fitocromo percorre um ciclo contínuo entre as duas formas. Nessa situação, as formas intermediárias do fitocromo acumulam-se e perfazem uma fração significativa da quantidade total de fitocromo. Esses intermediários poderiam até mesmo participar da iniciação ou amplificação das respostas do fitocromo sob luz natural, porém esta ainda é uma questão a ser resolvida.

O Pfr é a forma fisiologicamente ativa do fitocromo

Visto que as respostas do fitocromo são induzidas pela luz vermelha, elas poderiam, em teoria, resultar tanto do aparecimento da forma Pfr como do desaparecimento da forma Pr. Na maioria dos casos estudados, há uma relação quantitativa entre a magnitude da resposta fisiológica e a quantidade de Pfr gerado pela luz, porém não existe tal relação entre a resposta fisiológica e a perda de Pr.

Evidências desse tipo levaram à conclusão que o Pfr é a forma fisiologicamente ativa do fitocromo. Em casos nos quais foi demonstrado que a resposta do fitocromo não está quantitativamente relacionada à quantidade absoluta de Pfr, tem sido proposto que a razão entre Pfr e Pr, ou entre Pfr e a quantidade total de fitocromo, é que determina a magnitude da resposta.

A conclusão de que o Pfr é a forma ativa do fitocromo é sustentada por estudos com mutantes de *Arabidopsis* que são incapazes de sintetizar o fitocromo. Em plântulas do tipo selvagem, o alongamento do hipocótilo é fortemente inibido pela luz branca, sendo o fitocromo um dos fotorreceptores envolvidos na resposta. Quando cultivadas sob luz branca contínua, foram descobertas plântulas mutantes com hipocótilos longos, e denominadas mutantes *hy*. Diferentes mutantes *hy* são designados por números: *hy*1, *hy*2 e assim por diante. Devido ao fato de a luz branca ser composta por uma mistura de comprimentos de onda (incluindo vermelho, vermelho-distante e azul), foi possível demonstrar que alguns dos mutantes *hy* são deficientes em um ou mais fitocromo(s) funcional(is).

Os fenótipos dos mutantes fitocromo-deficientes têm sido úteis na identificação das formas fisiologicamente ativas do fitocromo. Se a resposta à luz branca, induzida pelo fitocromo (inibição do crescimento do hipocótilo), é causada pela ausência de Pfr, esses mutantes fitocromo-deficientes (que não possuem Pr nem Pfr) deveriam apresentar hipocótilos curtos tanto no escuro quanto na luz branca. Em vez disso, acontece o oposto; ou seja, eles apresentam hipocótilos longos tanto no escuro quanto na luz branca. É a ausência do Pfr que impede que as plântulas respondam à luz branca. Em outras palavras, o Pfr promove a resposta fisiológica.

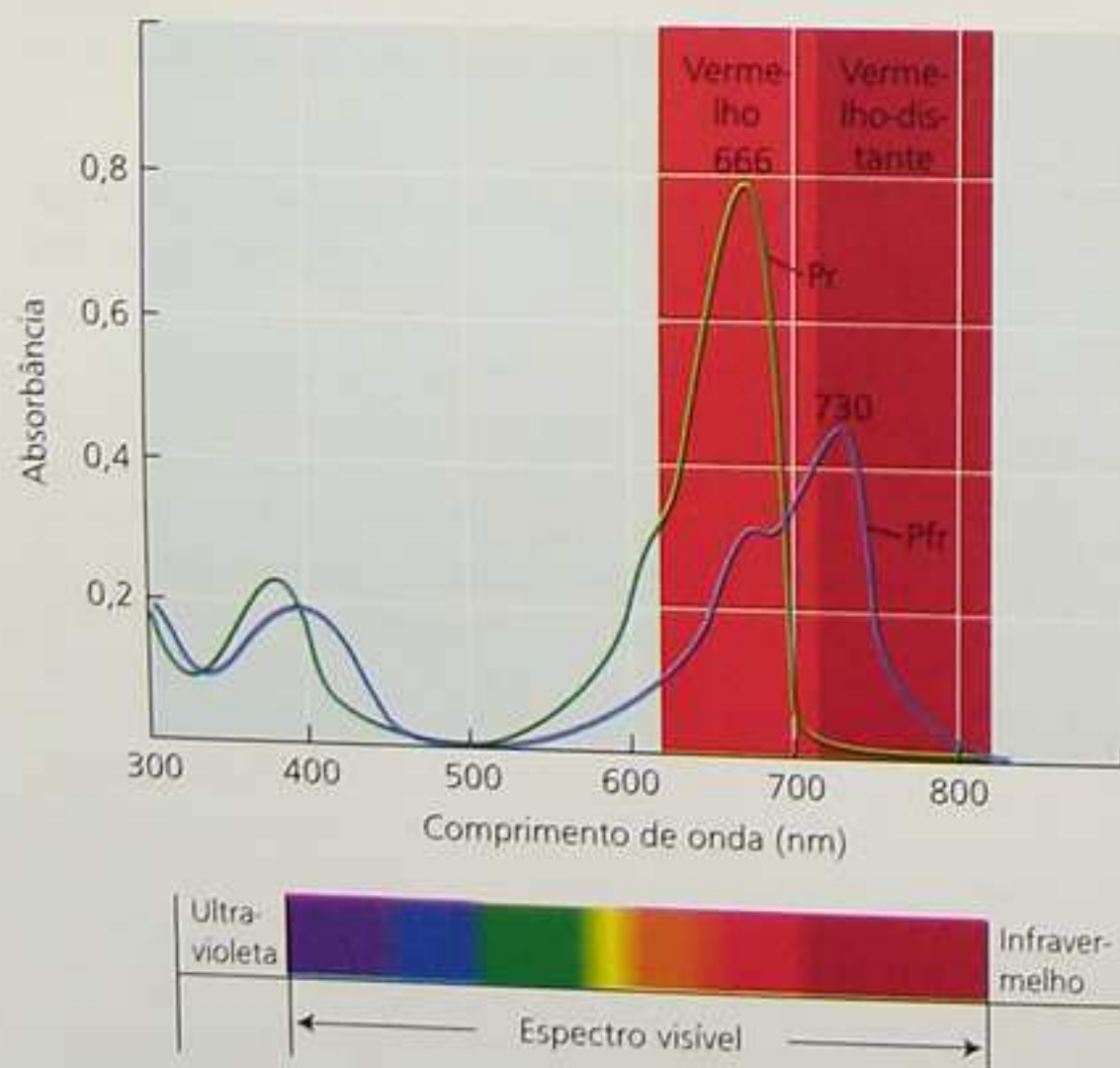



FIGURA 17.3 Os espectros de absorção de fitocromos purificados de aveia, nas formas Pr (linha verde) e Pfr (linha azul), sobrepõem-se (Vierstra e Quail, 1983).

O fitocromo é um dímero composto por dois polipeptídeos

O fitocromo nativo é uma proteína solúvel com uma massa molecular de aproximadamente 250 kDa. Ele ocorre como um dímero composto por duas subunidades equivalentes. Cada subunidade consiste de dois componentes: uma molécula de pigmento que absorve luz chamada de **cromóforo** e uma cadeia polipeptídica denominada **apoproteína**. O monômero da apoproteína tem uma massa molecular de aproximadamente 125 kDa. Juntos, a apoproteína e seu cromóforo formam a **holoproteína**. Nas plantas superiores, o cromóforo do fitocromo é um tetrapirrol linear, a **fitocromobilina**. Há somente um cromóforo por monômero de apoproteína e este é ligado à proteína através de uma ligação tioéter a um resíduo de cisteína (Figura 17.4).

Alguns pesquisadores, utilizando técnicas de microscopia eletrônica e dispersão por raios X, propuseram o modelo apresentado na Figura 17.5 para a forma Pfr do fitocromo (Nakasako e cols., 1990). O polipeptídeo dobra-se em dois domínios principais separados por uma região de articulação. O domínio maior, N-terminal, tem aproximadamente 70 kDa e carrega o cromóforo, enquanto o C-terminal, tem aproximadamente 55 kDa e contém o sítio onde os dois monômeros associam-se para formar o dímero (ver **Tópico 17.1 na Internet**).

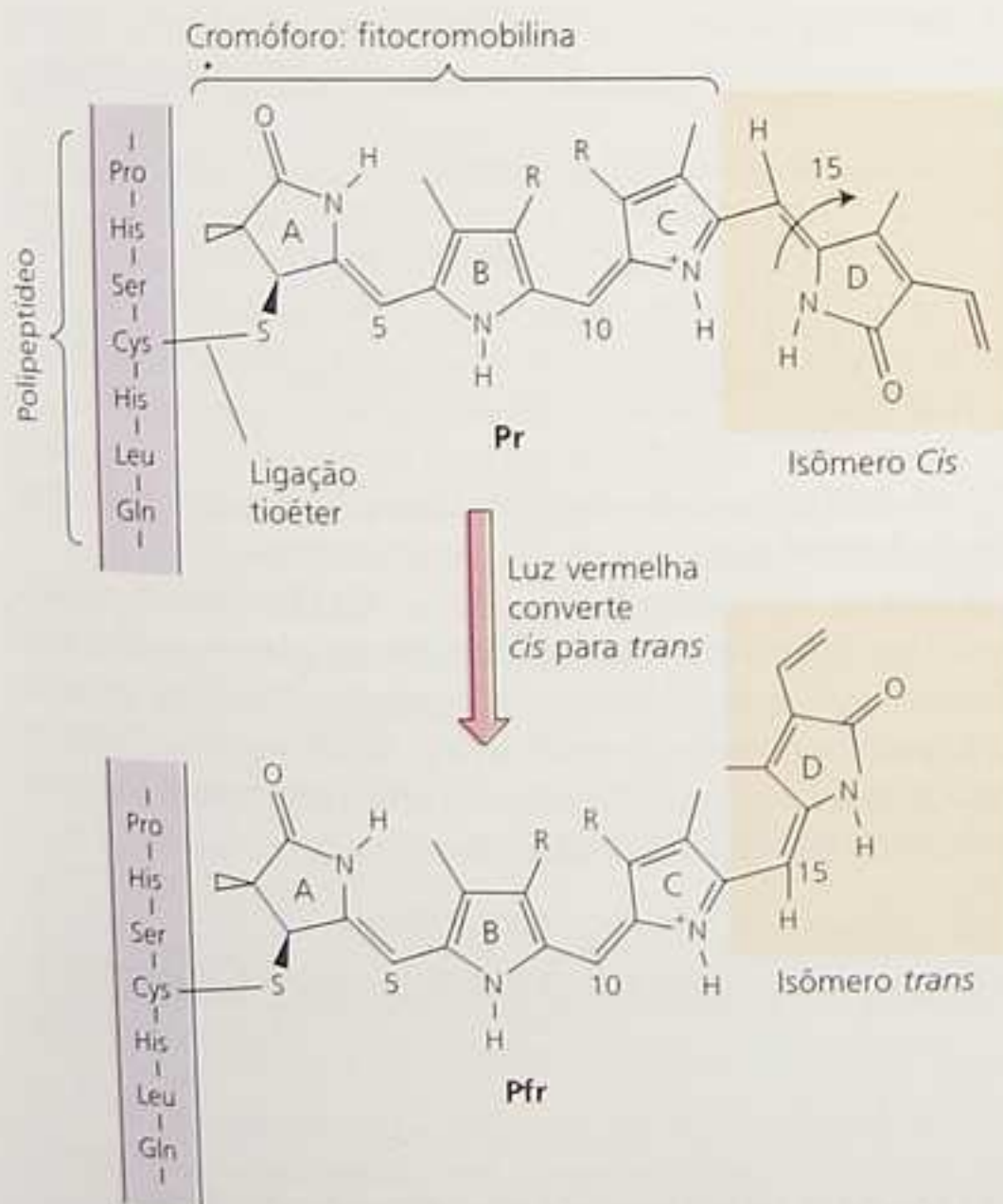



FIGURA 17.4 Estrutura das formas Pr e Pfr do cromóforo (fitocromobilina) e a região do peptídeo ligada ao cromóforo através de uma ligação tioéter. O cromóforo é submetido a uma isomerização *cis-trans* no carbono 15, em resposta à luz vermelha e vermelho-distante (Andel e cols., 1997).

A fitocromobilina é sintetizada em plastídeos

A apoproteína do fitocromo sozinha não consegue absorver luz vermelha ou vermelho-distante. A luz poderá ser absorvida somente quando o polipeptídeo estiver covalentemente ligado à fitocromobilina para formar a holoproteína. A fitocromobilina é sintetizada dentro de plastídeos e derivada do ácido 5-aminolevulínico via uma rota que ramifica a partir da rota biossintética da clorofila (ver **Tópico 7.11 na Internet**). Acredita-se que ela saia do plastídeo para o citosol por um processo passivo.

A montagem da apoproteína do fitocromo com seu cromóforo é **autocatalítica**; ou seja, ela ocorre espontaneamente, quando o polipeptídeo purificado do fitocromo é misturado com o cromóforo purificado em um tubo de ensaio, sem uso adicional de proteínas ou cofatores (Li e Lagarias, 1992). A holoproteína resultante tem propriedades espectrais semelhantes àquelas purificadas das plantas e exibe reversibilidade vermelho/vermelho-distante (Li e Lagarias, 1992).

Plantas mutantes que não têm capacidade de sintetizar o cromóforo são deficientes em processos que necessitam da ação do fitocromo, mesmo que os polipeptídeos da apoproteína estejam presentes. Por exemplo, vários dos mutantes *hy* citados anteriormente, nos quais a luz branca não reprime o alongamento do hipocótilo, possuem defeitos na biossíntese dos cromóforos. Em plantas mutantes *hy1* e *hy2*, os níveis de apoproteína do fitocromo são normais, mas há pouca ou nenhuma holoproteína espectralmente ativa. Quando um precursor do cromóforo é fornecido a essas plântulas, o crescimento normal é restabelecido.

O mesmo tipo de mutação foi observado em outras espécies. Por exemplo, o mutante amarelo-esverdeado do tomate tem propriedades similares às dos mutantes *hy*, sugerindo que ele também seja um mutante de cromóforo.

O cromóforo e a proteína passam por mudanças de conformação

Devido à absorção de luz pelo cromóforo, as alterações de conformação na proteína são iniciadas por alterações no próprio cromóforo. Com a absorção da luz, o cromóforo Pr passa por isomerização *cis-trans* da ligação dupla entre os carbonos 15 e 16 e uma rotação da ligação simples C14-C15 (ver Figura 17.4) (Andel e cols., 1997). Durante a conversão do Pr a Pfr, a porção de proteína da holoproteína do fitocromo passa por uma alteração sutil de conformação.

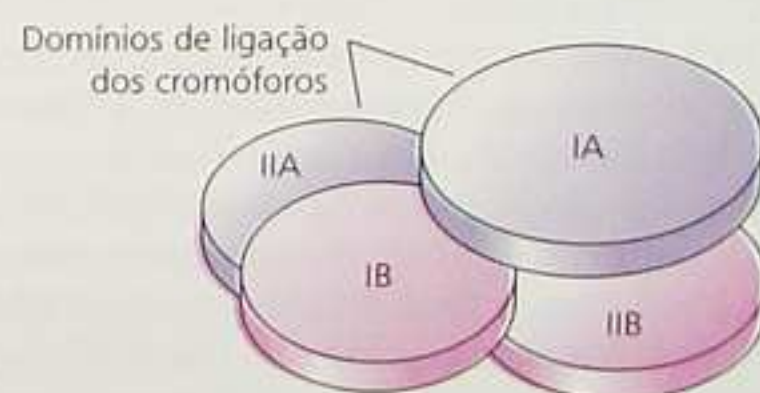



FIGURA 17.5 Estrutura do dímero do fitocromo. Os monômeros estão marcados I e II. Cada monômero consiste de um domínio de ligação dos cromóforos (A) e um domínio menor não-cromofórico (B). A molécula como um todo tem uma forma elíptica, em vez de globular (Tokutomi e cols., 1989).

Várias linhas de evidência sugerem que a alteração induzida pela luz na conformação do polipeptídeo ocorre tanto no domínio de ligação N-terminal do cromóforo como na região C-terminal da proteína.

Dois tipos de fitocromos foram identificados

O fitocromo é mais abundante em plântulas estioladas. Dessa forma, a maior parte dos estudos foi realizada com fitocromos purificados de tecidos não-verdes. Muito pouco fitocromo pode ser extraído de tecidos verdes e a porção que pode ser extraída difere na massa molecular da forma abundante do fitocromo encontrado em plantas estioladas.

As pesquisas têm demonstrado que existem duas classes diferentes de fitocromo com propriedades distintas. Estas foram denominadas fitocromo Tipos I e Tipo II (Furuya, 1993). O Tipo I é aproximadamente nove vezes mais abundante do que o II em plântulas de ervilha cultivadas no escuro; já em plântulas de ervilha cultivadas à luz, as quantidades dos dois tipos de fitocromo são quase iguais. Mais recentemente, foi demonstrado que os dois tipos são proteínas distintas.

A clonagem de genes que codificam diferentes polipeptídeos do fitocromo esclareceu a natureza distinta dos fitocromos presentes em plântulas estioladas e verdes. Mesmo em plântulas estioladas, o fitocromo é composto por uma mistura de proteínas relacionadas, codificadas por diferentes genes.

O fitocromo é codificado por uma família multigênica

A clonagem dos genes do fitocromo possibilitou a realização de uma detalhada comparação das seqüências de aminoácidos e das proteínas relacionadas. Viabilizou também, o estudo de seus padrões de expressão, tanto no nível de mRNA quanto de proteínas.

As primeiras seqüências de fitocromo clonadas foram de monocotiledôneas. Esses estudos e as pesquisas subseqüentes indicaram que os fitocromos são proteínas solúveis — uma descoberta consistente com estudos prévios de purificação. Um clone de DNA complementar que codifica o fitocromo da dicotiledônea *Cucurbita pepo* foi empregado para identificar cinco genes estruturalmente relacionados do fitocromo em *Arabidopsis* (Sharrock e Quail, 1989). Esta família de genes do fitocromo é denominada *PHY*, e seus cinco membros são *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*.

A apoproteína sozinha (sem o cromóforo) é designada PHY; a holoproteína (com o cromóforo) é designada phy. Por convenção, as seqüências de fitocromos de outras plantas superiores são denominadas de acordo com sua homologia com os genes *PHY* da *Arabidopsis*. As monocotiledôneas parecem possuir apenas representantes das famílias *PHYA* a *PHYC*, enquanto as dicotiledôneas possuem outras, derivadas por duplicação de genes (Mathews e Sharrock, 1997).

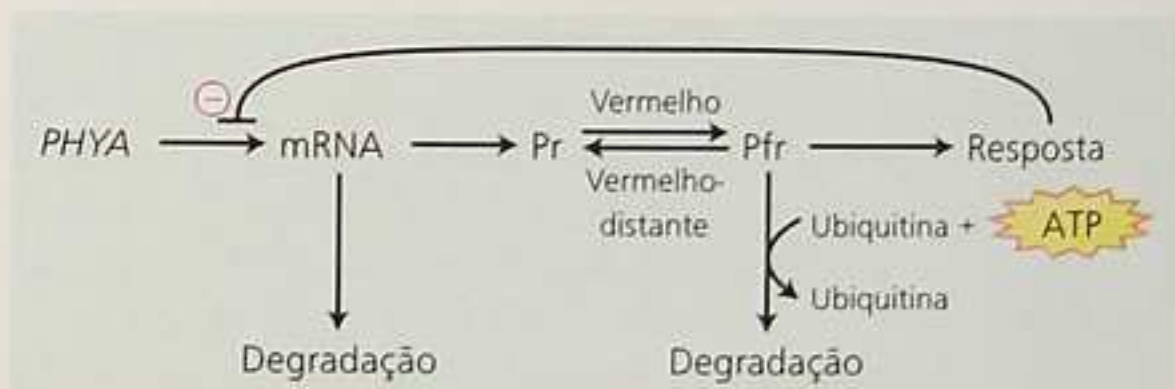
Alguns dos mutantes *hy* mostraram-se seletivamente deficientes em fitocromos específicos. Por exemplo, *hy3* é deficiente em phyB, e *hy1* e *hy2* são deficientes em cromóforo. Esses e outros mutantes *phy* têm sido úteis na determinação das funções fisiológicas dos diferentes fitocromos (como será discutido mais adiante neste capítulo).

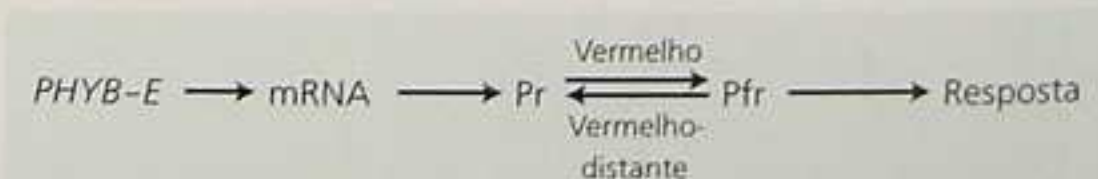
Os genes *PHY* codificam dois tipos de fitocromos

Com base em seus padrões de expressão, os produtos dos membros da família de genes *PHY* podem ser classificados como fitocromos Tipo I ou Tipo II. *PHYA* é o único gene que codifica um fitocromo Tipo I. Esta conclusão está baseada no padrão de expressão do promotor *PHYA*, bem como na acumulação de seu mRNA e polipeptídeos em resposta à luz. Estudos adicionais de plantas que contêm formas mutantes do gene *PHYA* (denominados alelos *phyA*) confirmaram esta conclusão e forneceram algumas indicações sobre o papel dos fitocromos em plantas intactas.

O gene *PHYA* é transcricionalmente ativo em plântulas cultivadas no escuro, porém sua expressão é fortemente inibida na luz em monocotiledôneas. Em aveia cultivada no escuro, o tratamento com luz vermelha reduz a síntese de fitocromo, porque a forma Pfr do fitocromo inibe a expressão de seu próprio gene. Além disso, o mRNA *PHYA* é instável, de modo que, quando plântulas de aveia estioladas são transferidas para a luz, o mRNA *PHYA* desaparece rapidamente. O efeito inibitório da luz na transcrição do *PHYA* é menos drástico em dicotiledôneas, e em *Arabidopsis* a luz vermelha não possui efeito mensurável sobre o *PHYA*.

A quantidade de phyA na célula também é regulada pela destruição da proteína. A forma Pfr da proteína, codificada pelo gene *PHYA*, chamado de **PfrA**, é instável. Existem evidências de que o PfrA pode se tornar marcado para destruição pelo sistema ubiquitina (Vierstra, 1994). Conforme discutido no **Capítulo 14 na Internet**, a *ubiquitina* é um pequeno polipeptídeo que se liga covalentemente às proteínas e serve como sítio de reconhecimento para um grande complexo proteolítico, o *proteassomo*.

Dessa forma, as aveias e outras monocotiledôneas perdem rapidamente a maior parte de seus fitocromos Tipo I (phyA) na luz, como resultado de uma combinação de fatores: inibição da transcrição, degradação do mRNA e proteólise:

Em dicotiledôneas, os níveis de phyA também declinam na luz, como resultado da proteólise, mas não tão drasticamente.

O restante dos genes *PHY* (*PHYB* a *PHYE*) codificam os fitocromos Tipo II. Embora sejam detectados em plantas verdes, tais fitocromos também estão presentes nas plantas estioladas. A razão disso é que a expressão de seu mRNAs não é significativamente alterada pela luz e as proteínas phy B a phy E codificadas são mais estáveis na forma Pfr do que na PfrA.

LOCALIZAÇÃO DO FITOCROMO EM TECIDOS E CÉLULAS

Valiosas indicações sobre a função de uma proteína podem ser obtidas a partir da determinação de onde ela está localizada. Não é surpresa, portanto, que muito esforço tem sido despendido

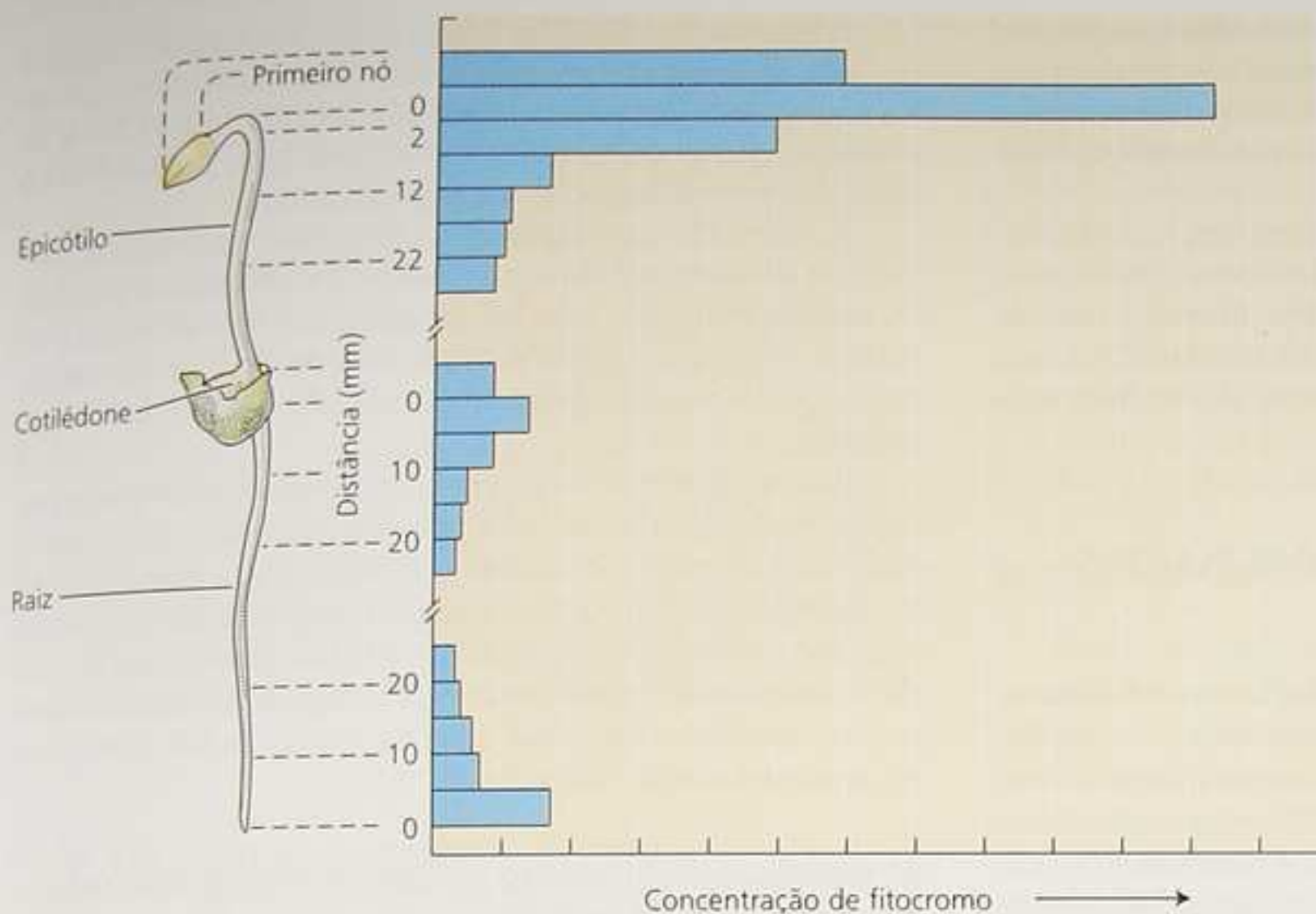



FIGURA 17.6 O fitocromo está mais fortemente concentrado nas regiões onde ocorrem alterações drásticas de desenvolvimento: meristemas apicais do epicótilo e raiz. Aqui é mostrada a distribuição do fitocromo numa plântula estiolada de ervilha, medida por espectrofotometria (Kendrick e Frankland, 1983).

na localização do fitocromo nos órgãos e tecidos, bem como dentro das próprias células.

O fitocromo pode ser detectado nos tecidos por meio de espectrofotometria

As propriedades fotorreversíveis singulares do fitocromo podem ser utilizadas para quantificar o pigmento com o auxílio de um espectrofotômetro. Uma vez que a sua cor é mascarada pela clorofila, o fitocromo é difícil de ser detectado em tecidos verdes. Em plantas cultivadas no escuro, onde não há a presença de clorofila, o fitocromo já foi detectado em muitos dos tecidos de angiospermas — tanto mono quanto dicotiledôneas — assim como em gimnospermas, samambaias, musgos e algas.

Em plântulas estioladas, o nível mais elevado de fitocromo é em geral encontrado nas regiões meristemáticas ou em regiões que recentemente foram meristemáticas, tais como as gemas e o primeiro nó de ervilha (Figura 17.6), ou o ápice e regiões nodais do coleóptilo de aveia. Contudo, as diferenças nos padrões de expressão entre as mono e as dicotiledôneas e entre os fitocromos Tipo I e Tipo II, tornam-se aparentes quando outros métodos mais sensíveis são utilizados.

O fitocromomo é expresso diferentemente em diferentes tecidos

A clonagem de genes *PHY* individuais tem possibilitado aos pesquisadores determinar, por vários métodos, os padrões de expressão de fitocromos individuais em tecidos específicos. As seqüências podem ser usadas diretamente para sondar mRNAs isolados de tecidos diferentes ou para analisar a atividade transcricional por meio de um gene-repórter, o qual revela visualmente os sítios de expressão gênica. Neste último método, o promotor de um gene *PHYA* ou *PHYB* é adicionado à porção de codificação de gene-repórter, tal como o gene para a enzima β-glucuronidase, o qual é chamado de GUS (lembrar que o promotor é a seqüência *upstream* do gene exigida para a transcrição).

A vantagem de utilizar a seqüência GUS é que ela codifica uma enzima que, mesmo em pequenas quantidades, converte um substrato incolor em um precipitado colorido, quando o substrato é fornecido à planta. Assim, as células em que o promotor *PHYA* está ativo serão coradas de azul e outras serão incolores. O gene híbrido, ou fundido, é colocado de volta na planta utilizando o plasmídeo Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, como um vetor (ver **Tópico 21.5 na Internet**).

Quando este método foi utilizado para examinar a transcrição de dois diferentes genes *PHYA* no tabaco, viu-se que as plântulas cultivadas no escuro continham as maiores quantidades de corante no gancho plumular e nas pontas das raízes, de acordo com estudos iniciais de imunologia (Adam e cols., 1994). O padrão de coloração em plântulas cultivadas na luz foi similar, porém, conforme esperado, com uma intensidade muito menor. Estudos similares com fusões de *Arabidopsis* *PHYA*-GUS e *PHYB*-GUS colocadas de volta em *Arabidopsis* confirmaram os resultados do *PHYA* encontrados para o tabaco e indicaram que o *PHYB*-GUS é expresso em níveis muito mais baixos do que o *PHYA*-GUS, em todos os tecidos (Somers e Quail, 1995).

Um estudo recente, comparando os padrões de expressão das fusões *PHYB*-GUS, *PHYD*-GUS e *PHYE*-GUS em *Arabidopsis* revelou que, embora esses promotores Tipo II sejam menos ativos do que os Tipo I, eles mostram distintos padrões de expressão (Goosey e cols., 1997). Assim, o quadro geral que emerge desses estudos é que os fitocromos são expressos em padrões distintos, mas que se sobrepõem.

Em síntese, os fitocromos são mais abundantes em tecidos jovens, indiferenciados, nas células onde há maior quantidade de mRNAs e os promotores são mais ativos. A forte correlação entre a abundância do fitocromo e as células que têm potencial para alte-

rações dinâmicas de desenvolvimento é consistente com o papel importante dos fitocromos no controle dessas alterações de desenvolvimento. Contudo, deve-se notar que os estudos discutidos aqui não questionam se os fitocromos são fotoativos como apoproteínas ou como holoproteínas.

Devido à sobreposição dos padrões de expressão de fitocromos individuais, não é surpresa que eles funcionem em cooperação, embora provavelmente também utilizem diferentes rotas de transdução de sinais. A sustentação para esta idéia também vem de estudos com fitocromos mutantes, os quais serão discutidos mais tarde neste capítulo.

CARACTERÍSTICAS DAS RESPOSTAS DAS PLANTAS INDUZIDAS POR FITOCROMOS

A variedade de respostas diferentes induzidas pelo fitocromo em plantas intactas é extensa, em termos dos tipos de respostas (ver Tabela 17.1) e da quantidade de luz necessária para induzir tais respostas. Um exame desta variedade irá mostrar o quanto os efeitos de um único fotoevento — a absorção da luz pelo Pr — são diversamente manifestados na planta. Para facilitar a discussão, as respostas induzidas pelo fitocromo podem ser agrupadas em dois tipos:

1. Eventos bioquímicos rápidos.
2. Mudanças morfológicas lentas, incluindo movimentos e crescimento.

Algumas das reações bioquímicas iniciais afetam respostas tardias de desenvolvimento. A natureza desses eventos bioquímicos iniciais, os quais compreendem rotas de transdução de sinais, será tratada em detalhe mais adiante neste capítulo. Aqui, serão focalizados os efeitos do fitocromo sobre as respostas da planta como um todo. Como se verá, tais respostas podem ser classificadas em vários tipos, dependendo da quantidade e da duração da luz exigida, assim como dos seus espectros de ação.

As respostas do fitocromo variam no *lag time* e no tempo de escape

As respostas morfológicas à fotoativação do fitocromo podem ser observadas visualmente após um *lag time* —, o tempo entre o estímulo e uma resposta observada. Esta pode ser muito curta, apenas alguns minutos, ou durar várias semanas. As respostas mais rápidas são, geralmente, os movimentos reversíveis das organelas (ver **Tópico 17.2 na Internet**) ou as alterações reversíveis de volume nas células (expansão ou encolhimento), mas mesmo algumas respostas de crescimento são extraordinariamente rápidas.

A inibição, pela luz vermelha, da taxa de alongamento do caule de quenopódio (*Chenopodium album*) cultivado na luz, é observada dentro de oito minutos, após o aumento do seu nível relativo de Pfr. Estudos de cinética, utilizando *Arabidopsis*, confirmaram esta observação e demonstraram ainda que o phyA age dentro de minutos após a exposição à luz vermelha (Parks e Spalding, 1999). Nesses estudos, a contribuição primária do phyA foi encerrada após três horas, quando a proteína phyA não pôde mais ser detectada pelo uso de anticorpos, e a contribuição do phyB aumentou (Morgan e Smith, 1978). *Lag times* mais longos, várias semanas, foram observados para a indução de florescimento (ver Capítulo 24).

A informação sobre o *lag time* para uma resposta do fitocromo serve de ajuda para os pesquisadores avaliarem os tipos de eventos bioquímicos que poderiam preceder e causar a indução de tal resposta. Quanto mais curto for o *lag time*, mais limitado será a gama de eventos bioquímicos que poderiam estar envolvidos.

A variedade nas respostas do fitocromo pode também ser vista no fenômeno chamado de **escape da fotorreversibilidade**. Os eventos induzidos pela luz vermelha são reversíveis pela luz vermelho-distante apenas por um período limitado de tempo, após o qual a resposta é dita "escapada" do controle da reversão pela luz.

Para explicar este fenômeno, um modelo admite que as respostas morfológica controladas pelo fitocromo são o resultado de seqüências de reações bioquímicas ligadas passo a passo nas células atingidas. Cada uma destas seqüências possui um ponto onde o retorno é impossível (do inglês, *point of no return*), além do qual ela prossegue irrevogavelmente para a resposta. O tempo de escape para diferentes respostas varia de menos de um minuto até, extraordinariamente, horas.

As respostas do fitocromo podem ser distinguidas pela quantidade de luz exigida

Além de ser distinguidas pelo *lag time* e tempo de escape, as respostas dos fitocromos podem ser distinguidas pela quantidade de luz exigida para induzi-las. A quantidade de luz é referida como a **fluência**[1], que é definida como o número de fótons atingindo uma unidade de área de superfície (ver **Capítulo 9, Tópico 9.1 na Internet**). As unidades mais comumente utilizadas para fluência são moles de *quanta* por metro quadrado (mol m^{-2}). Além da fluência, algumas respostas do fitocromo são sensíveis à **irradiância**[2], ou *taxa de fluência*, da luz. As unidades de irradiância, em termos de fótons, são moles de *quanta* por metro quadrado por segundo (mol m^{-2} s^{-1}).

Cada resposta do fitocromo possui uma faixa característica de fluências, na qual a magnitude da resposta é proporcional à fluência. Conforme mostrado na Figura 17.7, tais respostas enquadram-se em três categorias principais, com base na quantidade de luz exigida: respostas em fluência muito baixa (VLFRs; do inglês, *very-low-fluence responses*), respostas em fluência baixa (LFRs; do inglês, *low-fuence responses*) e respostas em irradiância alta (HIRs, do inglês *high-irradiance responses*).

As respostas em fluência muito baixa não são fotorreversíveis

Algumas respostas dos fitocromos podem ser iniciadas por fluências tão baixas como 0,0001 μmol m^{-2} (um décimo da quantidade de luz emitida por um vagalume em um único *flash*) e saturam (i. é, atingem um máximo) ao redor de 0,05 μmol m^{-2}. Por exemplo, em plântulas de aveia cultivadas no escuro, a luz vermelha pode estimular o crescimento do coleóptilo e inibir o crescimento do mesocótilo (o eixo alongado entre o coleóptilo e a raiz),

[1]Para a definição de *fluência*, *irradiância* e outros termos envolvidos na medição da luz, ver **Tópico 9.1 na Internet**.

[2]A irradiância é, em alguns casos, referida como intensidade luminosa. O termo *intensidade*, entretanto, refere-se à luz que é emitida pela fonte luminosa, enquanto que *irradiância* concerne a luz que incide sobre o objeto.

VLFR:
Reciprocidade se aplica, não reversível por luz FR

LFR:
Reciprocidade se aplica reversível por luz FR

HIR: Dependente da taxa de fluência, requer longa irradiação, e *não* é fotorreversível, a reciprocidade *não* se aplica

Resposta relativa

Log fluência (μmol m⁻²)

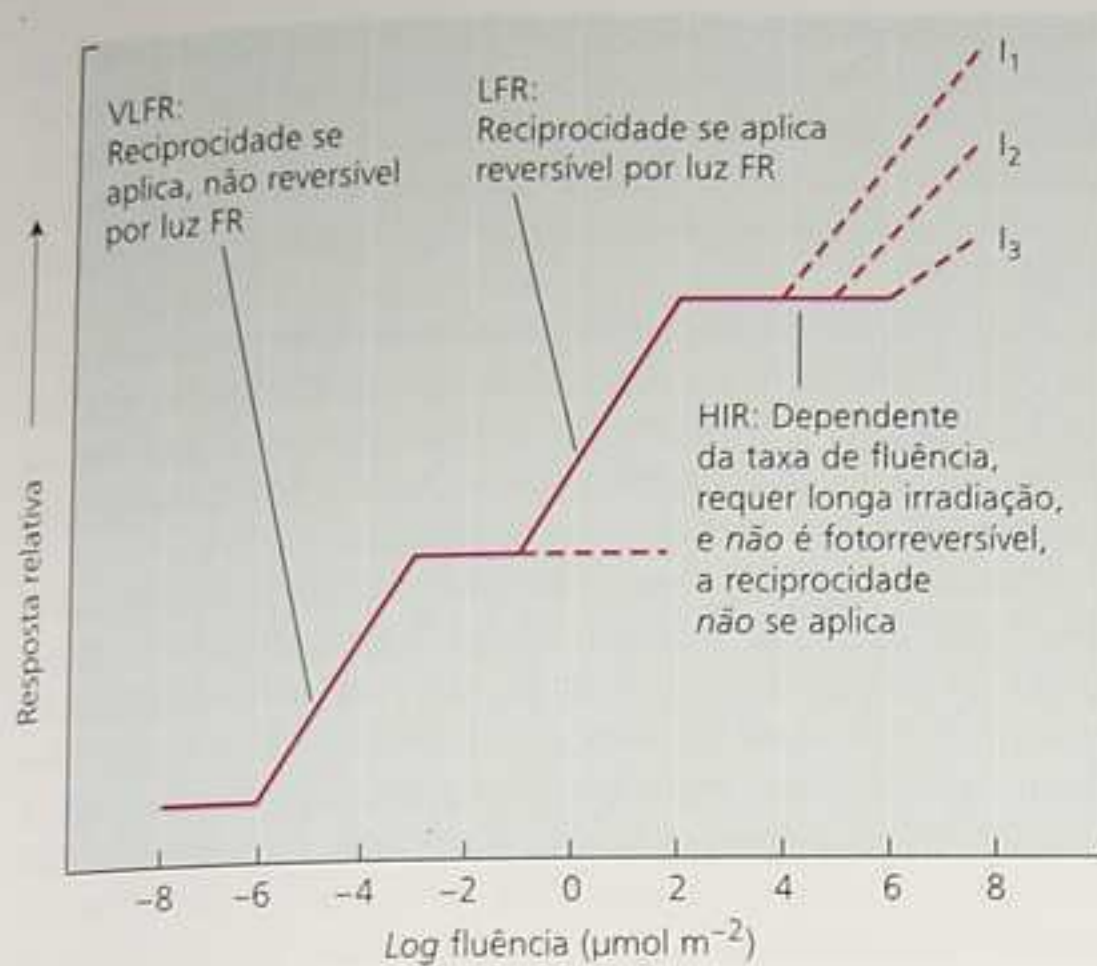



FIGURA 17.7 Três tipos de respostas do fitocromo, baseadas na sua sensibilidade à fluência. As magnitudes relativas das respostas representativas estão plotadas no gráfico contra fluências crescentes de luz vermelha. Curtos pulsos de luz ativam as VLFRs e LFRs. Visto que as HIRs são também proporcionais à irradiância, os efeitos de três diferentes irradiâncias fornecidas continuamente são ilustrados ($I_1 > I_2 > I_3$) (Briggs e cols., 1984).

sob estas baixas fluências. As sementes de *Arabidopsis* podem ser induzidas a germinar com a luz vermelha na faixa de 0,001 a 0,1 μmol m^{-2}. Esses efeitos marcantes, de níveis tão baixos de iluminação, são chamados de **respostas em fluência muito baixa (VLFRs)**.

A pouquíssima quantidade de luz necessária para induzir VLFRs converte menos do que 0,02% do fitocromo total a Pfr. Uma vez que a luz vermelho-distante, que normalmente reverteria um efeito da luz vermelha, converte 97% do Pfr a Pr (conforme já discutido), aproximadamente 3% do fitocromo permanece como Pfr — significativamnte mais do que o necessário para induzir VLFRs (Mandoli e Briggs, 1984). Assim, a luz vermelho-distante não pode reverter VLFRs. O espectro de ação de uma VLFR é igual ao espectro de absorção de Pr, sustentando a opinião que Pfr é a forma ativa para estas respostas (Shinomura e cols., 1996).

As implicações ecológicas do VLFR na germinação de sementes são discutidas no **Ensaio 17.1 na Internet**.

As respostas em fluência baixa são fotorreversíveis

Um outro conjunto de respostas do fitocromo não pode ser iniciado até que a fluência atinja 1,0 μmol m^{-2}, e as respostas saturam quando a fluência atinge 1.000 μmol m^{-2}. Essas respostas são chamadas de **respostas em fluência baixa (LFRs)** e incluem a maioria das respostas fotorreversíveis pela combinação vermelho/vermelho-distante, tais como a promoção da germinação de sementes de alface e a regulação dos movimentos foliares, mostradas na Tabela 17.1. O espectro de ação LFR para a germinação de sementes de *Arabidopsis* está mostrado na Figura 17.8. Os espectros LFR incluem um pico principal para a estimulação, na região do vermelho (660 nm), e um pico principal para a inibição na região do vermelho-distante (720 nm).

Tanto VLFRs quanto LFRs podem ser induzidas por breves pulsos de luz, uma vez que a quantidade total de energia luminosa atinja o total de fluência requerida pela resposta. A fluência total está em função de dois fatores: a taxa de fluência (mol m^{-2} s^{-1}) e o tempo de irradiação. Assim, um breve pulso de luz vermelha induzirá uma resposta, desde que a luz seja suficientemente intensa; por outro lado, uma luz muito fraca irá funcionar se o tempo de

Estimulação
Inibição
Eficiência quântica relativa
Comprimento de onda (nm)
Ultravioleta
Espectro visível

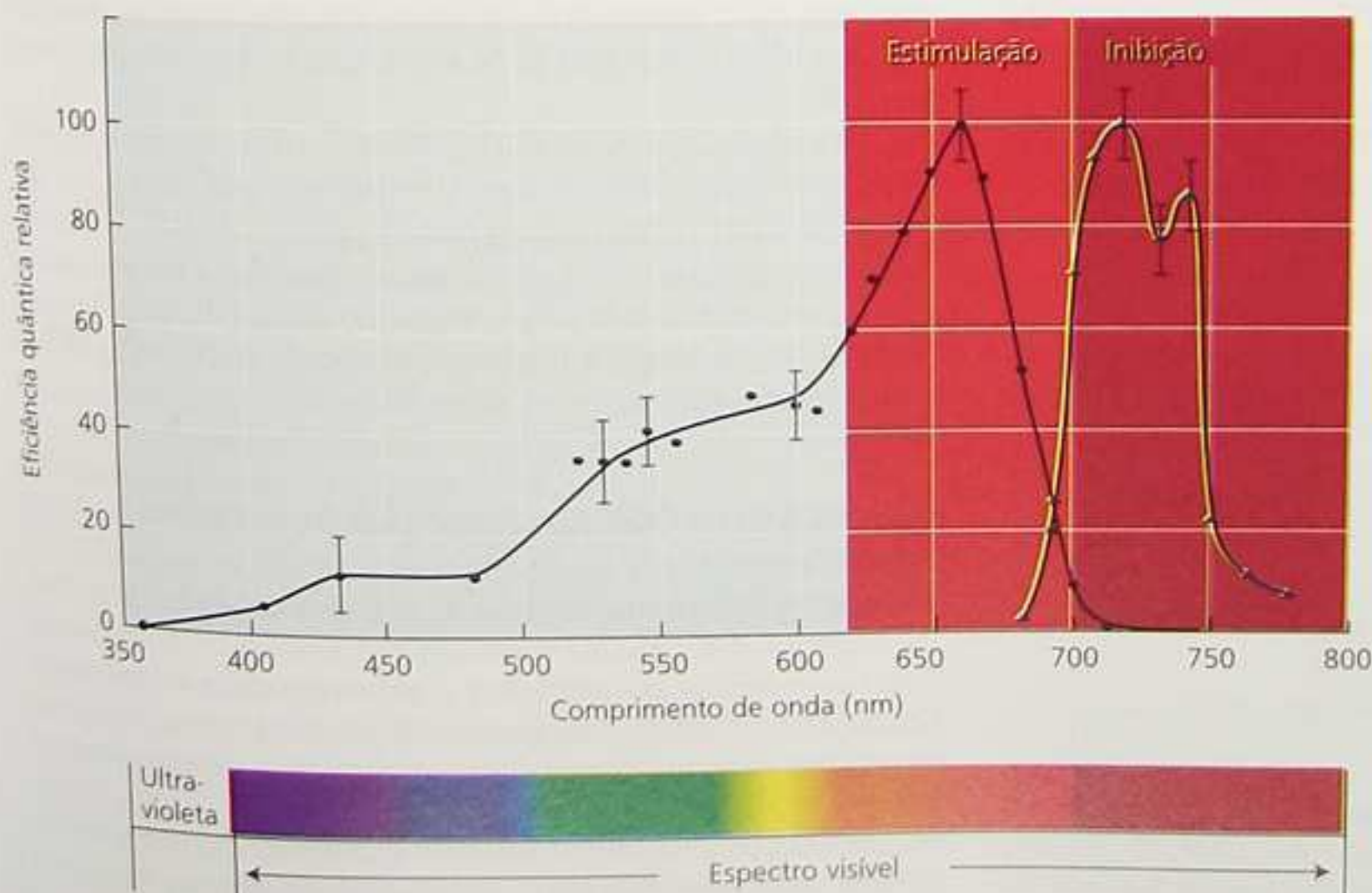



FIGURA 17.8 Espectros de ação de LFR para a estimulação e inibição fotorreversível da germinação de sementes de *Arabidopsis* (Shropshire e cols., 1961).

irradiação for suficientemente longo. Essa relação recíproca entre a taxa de fluência e o tempo é conhecida como a **lei da reciprocidade**, que foi formulada por R.W. Bunsen e H. E. Roscoe em 1850. Tanto VLFRs quanto LFRs obedecem à lei da reciprocidade.

As respostas em irradiância alta são proporcionais à irradiância e à duração

O terceiro tipo de respostas do fitocromo é denominado **respostas em irradiância alta (HIRs)**, várias das quais estão listadas na Tabela 17.2. As HIRs requerem uma exposição prolongada ou contínua à luz de irradiância relativamente alta, sendo a resposta proporcional à irradiância, dentro de certa faixa de amplitude.

A razão de serem chamadas de irradiância alta, em vez de respostas em fluência alta, é porque são proporcionais à irradiância (em linguagem pouco precisa, ao brilho da luz) em vez da fluência. As HIRs saturam em fluências muito mais altas do que LFRs — pelo menos 100 vezes maior — e não são fotorreversíveis. Uma vez que as HIRs não podem ser induzidas por exposição à luz fraca contínua nem por exposição à luz brilhante transiente, as HIRs não obedecem à lei da reciprocidade.

Muitas das LFRs fotorreversíveis listadas na Tabela 17.1, em particular aquelas envolvidas no desestiolamento, também qualificam como HIRs. Por exemplo, em fluências baixas o espectro de ação para a produção de antocianinas em plântulas de mostarda branca (*Sinapsis alba*) mostra um único pico na região do vermelho, efeito reversível com luz vermelho-distante, e a resposta obedece à lei da reciprocidade. Todavia, se as plântulas cultivadas no escuro são expostas à luz de irradiância alta por várias horas, o espectro de ação agora incluirá pico nas regiões do vermelho distante e do azul (ver próxima seção), o efeito deixa de ser fotorreversível e a resposta torna-se proporcional à irradiância. Assim, o mesmo efeito pode ser tanto um LFR ou um HIR, dependendo da sua história de exposição à luz.

O espectro de ação da HIR de plântulas estioladas possui picos nas regiões do vermelho-distante, azul e UV-A

As HIRs, tais como a inibição do crescimento do caule ou do hipocótilo, têm sido geralmente estudadas em plântulas estioladas cultivadas no escuro. O espectro de ação da HIR para a inibição do alongamento do hipocótilo em plântulas de alface cultivadas no escuro é mostrado na Figura 17.9. Para as HIRs, o principal pico de atividade esta na região do vermelho distante entre as máximas de absorção do Pr e Pfr, existindo ainda, picos nas regiões do azul e UV-A. Visto que a ausência de um pico na região do vermelho não é comum para uma resposta mediada pelo fitocromo, no início os pesquisadores acreditavam que outro pigmento poderia estar envolvido.

Uma grande quantidade de evidências hoje sustenta a opinião que o fitocromo é um dos fotorreceptores envolvido nas HIRs (ver **Tópico 17.3 na Internet**). Entretanto, já há algum tempo suspeita-se de que os picos nas regiões do azul e UV-A são devidos a um outro fotorreceptor que absorve luz azul e UV-A.

Para testar esta hipótese, o espectro de ação da HIR para inibição do alongamento do hipocótilo foi determinado em mutantes *hy2* de *Arabidopsis* cultivados no escuro, que possuem pouca ou nenhuma holoproteína do fitocromo. Como era esperado, as plântulas do tipo selvagem exibiram picos nas regiões do UV-A, azul e vermelho-distante do espectro. Por outro lado, o mutante *hy2* não respondeu à luz vermelha nem à luz vermelho-distante. Embora o mutante *hy2*, fitocromo-deficiente, não exibisse pico de absorção na região do vermelho-distante, ele mostrou uma resposta normal à luz azul e UV-A (Goto e cols., 1993).

Os resultados demonstram que o fitocromo não está envolvido na HIR, tanto para UV-A quanto para luz azul, e que um fotorreceptor azul/UV-A separado é o responsável pela resposta a esses comprimentos de onda. Estudos mais recentes indicam que os fotoreceptores de luz azul CRY1 e CRY2 estão envolvidos na inibição do alongamento do hipocótilo pela luz azul.

O espectro de ação da HIR das plantas verdes possui um pico principal na região do vermelho

Durante os estudos da HIR em plântulas estioladas, foi observado que a resposta à luz vermelho-distante contínua caía rapidamente no momento em que a plântulas começavam a adquirir a coloração verde. Por exemplo, o espectro de ação para a inibição do crescimento do hipocótilo de plântulas verdes da mostarda branca (*Sinapis alba*) cultivadas na luz é mostrado na Figura 17.10. Em geral, os espectros de ação da HIR para plantas cultivadas na luz exibe um único grande pico no vermelho, similar ao espectro de ação das LFRs (ver Figura 17.8), exceto que o efeito não é fotorreversível.

A perda de sensibilidade à luz vermelho-distante contínua está fortemente correlacionada com a redução do *pool* lábil à luz do fitocromo Tipo I, o qual consiste principalmente de phyA. Esta descoberta sugere que a HIR de plântulas estioladas à luz vermelho distante é mediada pelo phyA, enquanto que a HIR de plântulas verdes à luz vermelha é mediada pelo fitocromo Tipo II phyB e possivelmente outros.

TABELA 17.2
Algumas das respostas fotomorfogênicas das plantas induzidas pela irradiância alta

Síntese de antocianinas em várias plântulas de dicotiledôneas e em segmentos da casca da maçã.
Inibição do alongamento do hipocótilo em plântulas de mostarda, alface e petúnia.
Indução do florescimento em meimendro negro (*Hyoscyamus*).
Abertura do gancho plumular em alface.
Crescimento dos cotilédones em mostarda.
Produção de etileno em sorgo.

FUNÇÕES ECOLÓGICAS: EVITAÇÃO DE SOMBRA

Até agora, foram discutidas as respostas reguladas pelo fitocromo estudadas em laboratório. Entretanto, o fitocromo tem uma importante função ecológica para plantas crescendo no ambiente. Na discussão a seguir, será apresentado como as plantas sentem e respondem ao sombreamento por outras plantas, e como o fitocromo está envolvido na regulação de vários ritmos diários. Serão examinadas, também, as funções especializadas de diferentes membros da família de genes do fitocromo nesses processos.

FIGURA 17.9 Espectro de ação da HIR para inibição do alongamento do hipocótilo de plântulas de alface cultivadas no escuro. Os picos de atividade para a inibição do alongamento do hipocótilo ocorrem nas regiões do UV-A, azul e vermelho-distante do espectro (segundo Hartmann, 1967).

O fitocromo permite às plantas se adaptarem a alterações nas condições luminosas

A presença de um pigmento reversível em resposta à luz vermelho/vermelho-distante em todas as plantas verdes, das algas às dicotiledôneas, sugere que esses comprimentos de onda da luz fornecem informações que ajudam às plantas a se ajustarem ao ambiente. Que condições ambientais alteram os níveis relativos desses dois comprimentos de onda da luz na radiação natural?

A razão de luz vermelha (R) para vermelho-distante (FR) varia extraordinariamente em diferentes ambientes e pode ser definida como:

$$R/FR = \frac{\text{Taxa de fluência de fótons em bandas de 10 nm centradas em 660 nm}}{\text{Taxa de fluência de fótons em bandas de 10 nm centradas em 730 nm}}$$

Na Tabela 17.3, tem-se a comparação tanto do intensidade total de luz em fótons (400 — 800 nm) e os valores da razão R/FR em oito ambientes naturais. Ambos os parâmetros variam muito nos diferentes ambientes.

Em comparação com a luz solar direta, há relativamente mais luz vermelho-distante durante o pôr-do-sol, em uma profundidade de 5 mm de solo, ou sob um dossel de outras plantas (como no subbosque de uma floresta). O fenômeno do dossel resulta do fato que as folhas verdes absorvem a luz vermelha devido ao seu alto teor de clorofila, porém são relativamente transparentes à luz vermelho-distante.

A razão R:FR e o sombreamento. Uma função importante do fitocromo é que ele possibilita às plantas perceber o sombreamento por outras plantas. As plantas que alongam o caule em resposta ao sombreamento são ditas exibir uma **resposta de evitação da sombra**. Conforme aumenta o sombreamento, a razão R:FR diminui. A maior proporção de luz vermelho-distante converte mais Pfr a Pr e

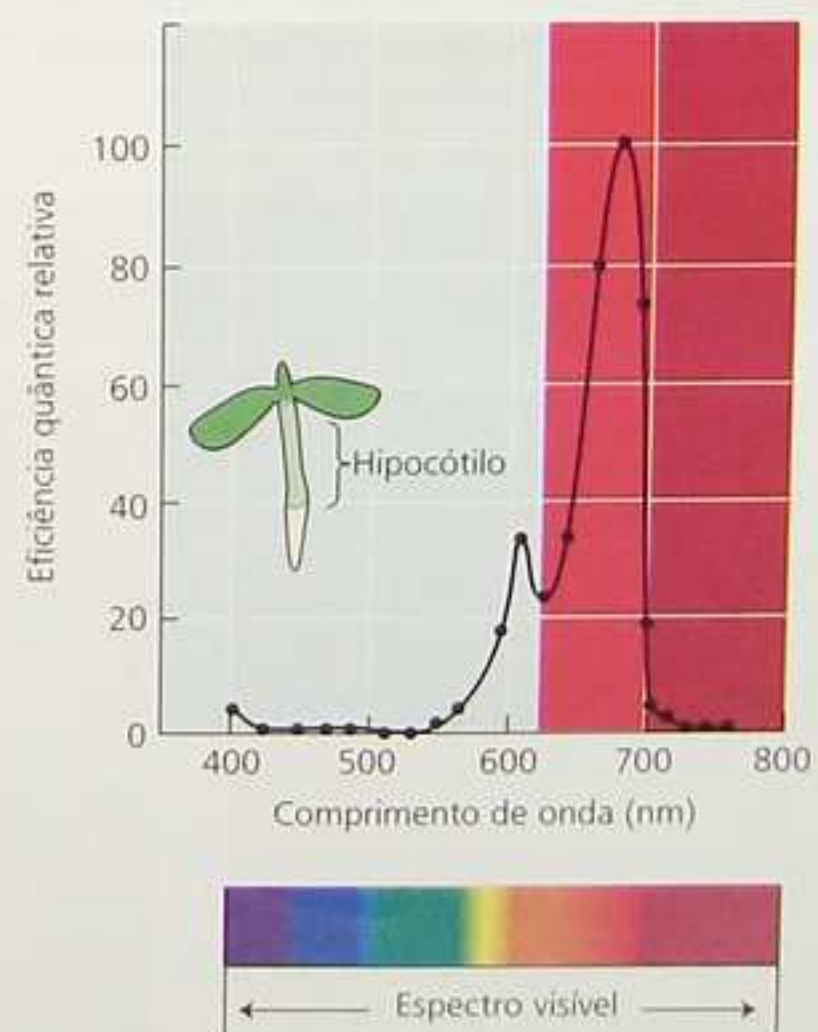



FIGURA 17.10 Espectro de ação da HIR para a inibição do alongamento do hipocótilo de plântulas de mostarda branca (*Sinapsis alba*) cultivadas na luz (segundo Beggs e cols., 1980).

a razão de Pfr para fitocromo total (Pfr/Ptotal) diminui. Simulando-se a radiação natural para variar o conteúdo de vermelho-distante, descobriu-se que para as chamadas plantas de sol (plantas que geralmente crescem em hábitats de campo aberto), quanto maior o conteúdo de vermelho distante (i. é, a menor razão Pfr/Ptotal), maior era a taxa de alongamento do caule (Figura 17.11).

Em outras palavras, o sombreamento simulado de um dossel (altos níveis de luz vermelho-distante) induzia estas plantas a alocar uma maior parte dos seus recursos para crescimento em altura. Esta correlação não é sustentada para as "plantas de sombra", as quais normalmente crescem em ambientes sombreados. As plantas de sombra mostraram pouca ou nenhuma redução na taxa de alongamento de seus caules, na medida em que eram expostas a valores de R/FR maiores (ver Figura 17.11). Assim, parece haver uma relação sistemática entre o crescimento controlado pelo fitocromo e o hábitat da espécie. Tais resultados são tomados como uma indicação do envolvimento do fitocromo na percepção da sombra.

Para uma "planta de sol" ou "planta que evita a sombra", existe um claro valor adaptativo em alocar em seus recursos em direção a um crescimento mais rápido em extensão, quando ela é sombreada por outra planta. Assim, ela pode aumentar suas chances de crescer acima do dossel e adquirir uma maior porção de radiação fotossinteticamente ativa não-filtrada. O preço pago por favorecer o alongamento dos entrenós é uma redução em área foliar e redução nas ramificações, mas, ao menos no curto prazo, esta adaptação à sombra do dossel parece funcionar.

FIGURA 17.11 Papel do fitocromo na percepção da sombra em plantas de sol (linha contínua) *versus* plantas de sombra (linha tracejada) (segundo Morgan e Smith, 1979).

A razão R:FR e a germinação de sementes. A qualidade da luz também participa na regulação da germinação de algumas sementes. Como vimos anteriormente, o fitocromo foi descoberto em estudos de germinação de sementes de alface dependentes da luz.

Em geral, espécies com sementes grandes, com amplas reservas para sustentar prolongados períodos de crescimento de plântulas no escuro (p. ex., sob o solo), não necessitam de luz para a germinação. Entretanto, a exigência de luz é freqüentemente observada nas sementes pequenas de espécies herbáceas e gramíneas, muitas das quais permanecem dormentes, mesmo quando hidratadas, se estão enterradas abaixo da profundidade de penetração da luz. Mesmo quando essas sementes estão na superfície do solo ou próximas dela, o nível de sombreamento pelo dossel da vegetação (i. é, a razão R:FR que elas recebem) provavelmente afetará a sua germinação. Por exemplo, é bem documentado que o enriquecimento em vermelho distante provocado pelo dossel de folhas inibe a germinação de uma gama de espécies de sementes pequenas.

Para as sementes pequenas da embaúba (*Cecropia obtusifolia*), uma espécie tropical, e da pimenta Veracruz (*Piper auritum*) semeadas no sub-bosque de floresta densamente sombreada, essa inibição pode ser revertida se um filtro que permita a passagem do componente vermelho da luz sombreada pelo dossel, enquanto bloqueia o componente vermelho distante, for colocado imediatamente acima das sementes. Embora o dossel transmita muito pouca luz vermelha, o nível é suficiente para estimular a germinação das sementes, provavelmente porque a maior parte da luz vermelho distante inibitória é excluída pelo filtro e a razão R:FR, muito alta. Essas sementes teriam, também, uma maior chance de germinação em espaços que recebam luz solar direta por meio de clareiras (do inglês, *gaps*) no dossel,

TABELA 17.3
Parâmetros de luz ecologicamente importantes

	Densidade de fluxo de fótons (μmol m^{-2} s^{-1})	R/FR[a]
Luz do dia	1900	1,19
Pôr-do-sol	26,5	0,96
Luar	0,005	0,94
Dossel de Hera	17,7	0,13
Lagos, a 1 m de profundidade		
Black Loch	680	17,2
Loch Leven	300	3,1
Loch Borralie	1200	1,2
Solo, a 5 mm de profundidade	8,6	0,88

Fonte: Smith 1982, p. 493.
Nota: O fator de intensidade luminosa (400-800 nm) é dado com a densidade de fluxo de fótons e a luz de ativação do fitocromo é dada como a razão R/FR.
[a]Valores absolutos tomados de medições em espectrofotômetros; os valores devem ser considerados como indicadores das relações entre as diferentes condições naturais e não como médias dos ambientes.

do que em espaços densamente sombreados. A luz solar ajudaria a garantir que as plântulas tornem-se fotossinteticamente auto-suficientes, antes que suas reservas sejam exauridas.

Como será tratado mais adiante, estudos recentes com sementes de alface dependentes da luz têm mostrado que a germinação induzida pela luz vermelha é resultado de um aumento no nível da forma biologicamente ativa do hormônio giberelina. Assim, o fitocromo pode promover a germinação de sementes através de seus efeitos na biossíntese de giberelina (ver Capítulo 20).

FUNÇÕES ECOLÓGICAS: RITMOS CIRCADIANOS

Vários processos metabólicos nas plantas, tais como a liberação do oxigênio e a respiração, exibem um ciclo alternado por fases de alta e baixa atividade, com uma periodicidade regular de aproximadamente 24 horas. Tais alterações rítmicas são referidas como **ritmos circadianos** (do latim *circa diem*, que significa "aproximadamente um dia"). O **período** de um ritmo é o tempo que passa entre dois picos ou vales sucessivos no ciclo. Devido à persistência do ritmo na ausência de fatores de controle externos, ele é considerado **endógeno.**

A natureza endógena dos ritmos circadianos sugere que eles sejam governados por um regulador interno, chamado de **oscilador.** O oscilador endógeno está acoplado a uma variedade de processos fisiológicos. Uma característica importante do oscilador é que ele não é afetado pela temperatura, o que permite ao relógio funcionar normalmente sob uma variedade de condições climáticas e sazonais. Diz-se que o relógio exibe uma **compensação de temperatura.**

A luz é um forte modulador de ritmos tanto em plantas como em animais. Embora ritmos circadianos, que persistem sob condições controladas de laboratório, geralmente apresentem períodos uma ou mais horas mais longos ou curtos do que 24 horas, na natureza seus períodos tendem a ser uniformemente próximos a 24 horas, devido aos efeitos sincronizantes da luz ao amanhecer, chamados de ***sincronização***. Tanto a luz vermelha quanto a azul são efetivas na *sincronização*. O efeito da luz vermelha é fotorreversível pela luz vermelho-distante, indicativo do fitocromo; o efeito da luz azul é mediado por um fotorreceptor(es) de luz azul.

O fitocromo regula os movimentos de fechamento das folhas

Os movimentos de fechamento das folhas, chamados de **nictinastia**, são um bom exemplo de ritmo circadiano vegetal regulado pela luz. Na nictinastia, as folhas e/ou folíolos estendem-se horizontalmente (abrem) para interceptar luz durante o dia e se dobram verticalmente (fecham) à noite (Figura 17.12). Movimentos foliares nictinásticos são exibidos por muitas leguminosas, tais como *Mimosa*, *Albizia* e *Samanea*, bem como membros da família *Oxalidaceae*. As alterações no ângulo das folhas ou folíolos são causadas por mudanças rítmicas de turgor nas células do pulvino (do latim, *pulvinus*), uma estrutura especializada localizada na base do pecíolo.

Uma vez iniciado, o ritmo de abertura e fechamento persiste mesmo em constante escuro, tanto em plantas intactas como em folíolos isolados (Figura 17.13). A fase do ritmo (ver Capítulo 24), entretanto, pode ser modificada por vários sinais exógenos, inclusive a luz vermelha ou azul.

A luz afeta também diretamente o movimento: a luz azul estimula os folíolos fechados a abrirem e a luz vermelha, seguida por escuro, provoca o fechamento dos folíolos abertos. Os folíolos começam a fechar cinco minutos após serem transferidos para o escuro, sendo o fechamento completado em 30 minutos. O fitocromo regula o fechamento dos folíolos, pois o efeito da luz vermelha pode ser cancelado pela luz vermelho-distante.

O mecanismo fisiológico dos movimentos foliares é bem conhecido. Eles resultam de alterações de turgor em células localizadas em lados opostos do pulvino, chamadas de **células motoras ventrais** e de **células motoras dorsais** (Figura 17.14). Tais alterações na pressão de turgor dependem dos fluxos de K^+ e Cl^- através da membrana plasmática das células motoras ventrais e dorsais. Os folíolos abrem quando as células motoras dorsais acumulam K^+ e Cl^-, causando um intumescimento dessas células, enquanto as células motoras ventrais liberam K^+ e Cl^-, causando a sua murcha. A reversão desse processo resulta no fechamento dos folíolos. O fechamento dos folíolos é, portanto, um exemplo de uma resposta rápida ao fitocromo, envolvendo fluxo de íons pelas membranas.

A expressão gênica e os ritmos circadianos. O fitocromo pode interagir também com os ritmos circadianos no nível da expressão gênica. A expressão de genes na família *LHCB*, que codifica as proteínas do sistema de captação de luz ligados às clorofilas *a/b* do fotossistema II, é regulada no nível de transcrição tanto pelo ritmo circadiano quanto pelo fitocromo.

Em folhas de ervilha e de trigo, tem sido constatado que o nível de mRNA do *LHCB* oscila durante ciclos diários de luz-escuro, aumentando pela manhã e caindo ao entardecer. Uma vez que o ritmo persiste mesmo quando em escuro contínuo, ele parece ser um ritmo circadiano. Entretanto, o fitocromo pode perturbar este padrão cíclico de expressão.

(A) (B)

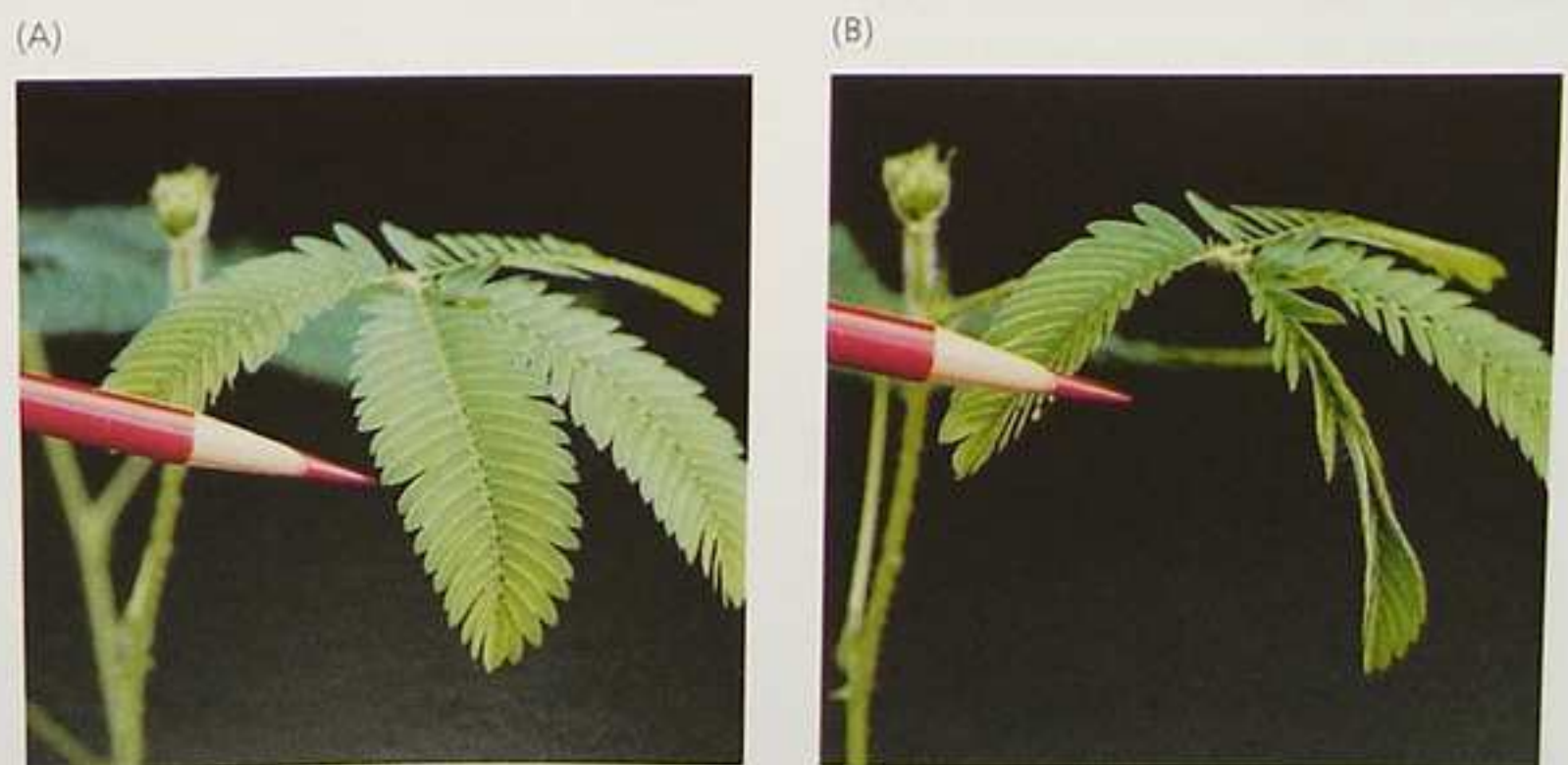



FIGURA 17.12 Movimentos foliares nictinásticos de *Mimosa pudica*. (A) Folíolos abertos. (B) Folíolos fechados (fotos © David Sieren/Visuals Unlimited).

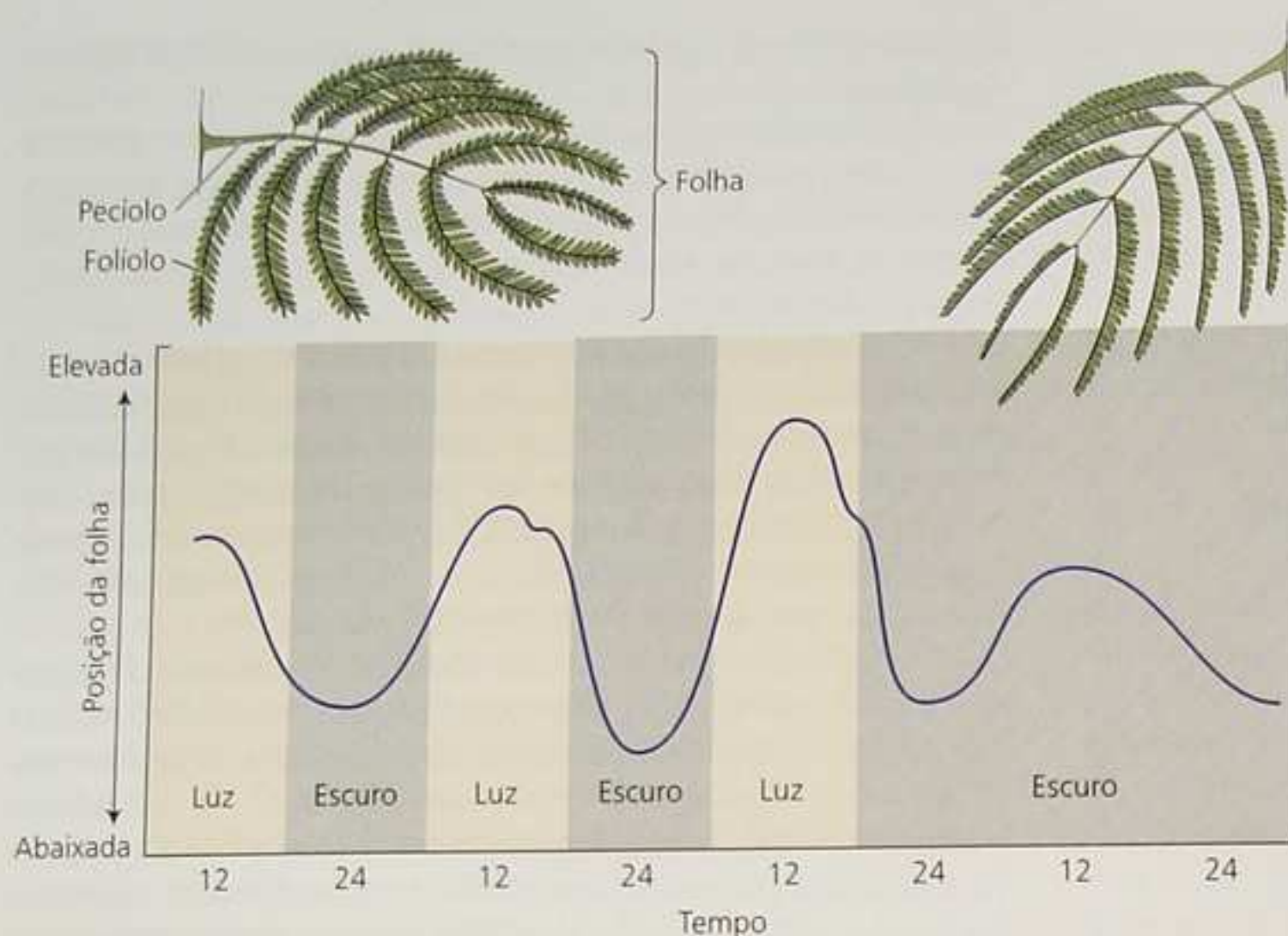



FIGURA 17.13 Ritmo circadiano nos movimentos diários de folhas de *Albizia*. As folhas são elevadas pela manhã e abaixadas ao entardecer. Paralelamente à elevação e ao abaixamento das folhas, os folíolos abrem e fecham. O ritmo persiste com menor amplitude por um tempo limitado em escuridão total.

Quando plantas de trigo são transferidas de um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro para escuro contínuo, o ritmo persiste por um certo tempo, porém lentamente reduz sua amplitude, até que não são mais identificados picos ou depressões. Se, no entanto, as plantas forem submetidas a um pulso de luz vermelha antes de serem transferidas para o escuro contínuo, este fenômeno não ocorre (i. é, os níveis de mRNA do *LHCB* continuam a oscilar, conforme eles fazem durante os ciclos luz-escuro).

Por outro lado, um *flash* de luz vermelho-distante ao final do dia impede a expressão do *LHCB* em escuro contínuo e o efeito da luz vermelho-distante é revertido pela luz vermelha. Deve ser destacado que não é o oscilador que reduz a oscilação sob condições constantes, mas, sim, o acoplamento do oscilador ao evento fisiológico sendo monitorado. A luz vermelha restaura o acoplamento entre o oscilador e o processo fisiológico.

Genes do relógio circadiano de *Arabidopsis* foram identificados

O isolamento de mutantes do relógio tem se constituído em uma importante ferramenta para a identificação de genes do relógio em outros organismos. O isolamento de mutantes do relógio em plantas requer um teste adequado que permita o monitoramento do ritmo circadiano de milhares de indivíduos para detectar o fenótipo anormal raro.

A fim de permitir a procura por mutantes do relógio em *Arabidopsis*, a região promotora do gene *LHCB* foi fundida ao gene que codifica a luciferase, uma enzima que emite luz na presença de seu substrato, luciferina. Esse gene-repórter construído foi, então, utilizado para transformar *Arabidopsis* com o plasmídeo Ti de *Agrobacterium* como um vetor. Os pesquisadores puderam, assim, monitorar a regulação temporal e espacial da bioluminescência em plântulas individuais em tempo real, utilizando uma câmera de vídeo (Millar e cols., 1995).

Um total de 21 mutantes independentes ***toc*** (tempo de expressão do CAB [*LHCB*]) foram isolados, incluindo linhagens de curto período e de longo período. Os mutantes *toc1*, em particular, estão envolvidos no mecanismo oscilador central (Strayer e cols., 2001). Um modelo para o oscilador endógeno será discutido mais adiante neste capítulo.

FUNÇÕES ECOLÓGICAS: ESPECIALIZAÇÃO DO FITOCROMO

O fitocromo é codificado por uma família de múltiplos genes: de *PHYA* a *PHYE*. Embora exista uma grande similaridade entre suas estruturas, cada um desses fitocromos desempenha funções distintas na vida da planta. Nesta seção, será discutido o estado atual do conhecimento sobre as funções ecológicas dos diferentes fitocromos, enfocando primeiramente o phyA e o phyB.

O fitocromo B medeia as respostas à luz branca ou vermelha contínua

No início, suspeitava-se que o fitocromo B participasse das respostas à luz contínua, pois o mutante *hy3* (hoje chamado de

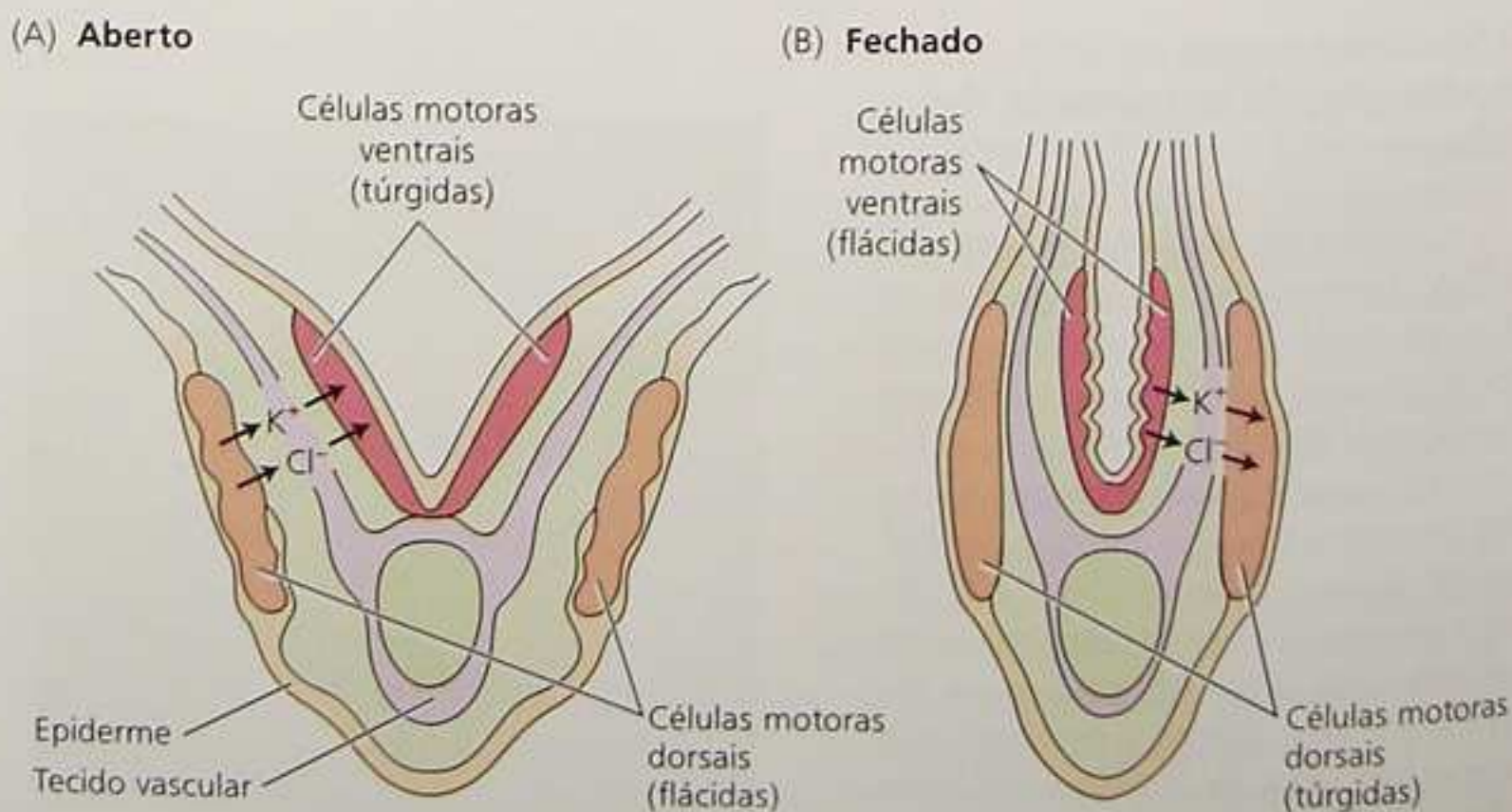



FIGURA 17.14 Os fluxos de íons entre as células motoras dorsais e ventrais dos pulvinos de *Albizia* regulam a abertura e fechamento dos folíolos (segundo Galston, 1994).

phyB), que apresenta longos hipocótilos sob a influência de luz branca aplicada de forma contínua, possuía um gene *PHYB* alterado. Nesses mutantes, o mRNA *PHYB* apresentava-se em quantidade reduzida ou estava ausente, com pouca ou nenhuma proteína *phyB* podendo ser detectada. Em comparação, os níveis de mRNA *PHYA* e proteína *phyA* eram normais.

O fitocromo B medeia o evitamento da sombra, regulando o comprimento do hipocótilo em resposta à luz vermelha aplicada em pequenos pulsos de baixa fluência ou continuamente; como poderia ser esperado, o mutante *phyB* é incapaz de responder ao sombreamento com aumento do comprimento do hipocótilo. Além disso, essas plantas não alongam seus hipocótilos em reposta à luz vermelho-distante aplicada ao final de cada fotoperíodo (chamada de *resposta ao vermelho-distante de final do dia*). Ambas as respostas provavelmente envolvem a percepção da razão Pfr:Ptotal e ocorrem na região de baixa fluência do espectro. Embora o phyB esteja envolvido no centro da resposta de evitação da sombra, evidências sugerem que outros fitocromos também tenham papel importante (Smith e Whitelam, 1997).

O mutante *phyB* é deficiente em clorofila e alguns mRNA que codificam proteínas do cloroplasto, além de ter pouca capacidade de responder aos hormônios vegetais. Uma vez que a mutação *PHYB* resulta em uma percepção deficiente da luz vermelha contínua, a presença de outros fitocromos pode não ser suficiente para conferir a capacidade de resposta à luz vermelha contínua ou à luz branca.

O fitocromo B parece também regular a germinação fotorreversível de sementes, o fenômeno que levou, originalmente, à descoberta do fitocromo. As sementes do tipo selvagem de *Arabidopsis* necessitam de luz para germinação, e esta resposta apresenta a reversibilidade vermelho/vermelho-distante na faixa de baixa fluência. Mutantes que não possuem o phyA respondem normalmente à luz vermelha; mutantes deficientes em phyB não são capazes de responder à luz vermelha de baixa fluência (Shinomura e cols., 1996). Este evidência experimental sugere fortemente que o phyB medeia a germinação fotorreversível de sementes.

O fitocromo A é necessário para a resposta à luz vermelho-distante contínua

Nenhuma outra mutação gênica, além do *phyB*, foi encontrada na coleção original *hy*, de forma que para a identificação dos mutantes *phyA* foi necessário o desenvolvimento de procedimentos mais engenhosos. Conforme foi discutido, pelo fato de as HIRs ao vermelho-distante sabidamente necessitarem do fitocromo fotolábil (Tipo I), suspeitou-se que o phyA deveria ser o fotorreceptor envolvido na percepção da luz vermelho-distante contínua. Se isso é verdadeiro, os mutantes phyA não deveriam responder à luz vermelho-distante contínua e crescer altos e afilados sob tais condições luminosas. Entretanto, mutantes que não possuem o cromóforo também teriam esta aparência, pois o phyA pode detectar a luz vermelho-distante somente quando montado juntamente com o cromóforo no holofitocromo.

Para selecionar apenas os mutantes phyA, as plântulas que cresceram altas sob luz vermelho-distante contínua foram, após, cultivadas sob luz vermelha contínua. Os mutantes deficientes em phyA podem crescer normalmente sob este regime, mas um mutante deficiente em cromóforo, que também não possui phyB funcional, não responde. As plântulas mutantes *phyA* selecionadas neste procedimento não tinham um fenótipo óbvio, quando cultivadas em luz branca normal, confirmando que o phyA não tem um papel definido na percepção da luz branca.

Isto também explica por que os mutantes *phyA* não foram detectados no procedimento original de identificação dos hipocótilos longos. Assim, o phyA parece ter um papel limitado na fotomorfogênese, restrito principalmente ao desestiolamento e às respostas ao vermelho-distante. Por exemplo, o phyA seria importante quando as sementes germinam sob um dossel que filtra a maior parte da luz vermelha.

Igualmente fica claro, a partir desse fenótipo de luz vermelho-distante constante, que nenhum dos demais fitocromos é suficiente para a percepção da luz vermelho-distante constante; apesar da capacidade de todos os fitocromos de absorver as luzes vermelha e vermelho distante, pelo menos o phyA e phyB possuem papéis distintos com a esse respeito.

O fitocromo A também parece estar envolvido na germinação VLFR de sementes de *Arabidopsis*. Assim, os mutantes sem phyA não podem germinar em resposta à luz vermelha na faixa de fluência muito baixa, porém eles mostram uma resposta normal à luz vermelha na faixa de baixa fluência (Shinomura e cols., 1996). Este resultado demonstra que o phyA funciona como o fotorreceptor primário para esta VLFR, embora evidências recentes sugiram que phyE é necessário para este componente da germinação de sementes (Hennig e cols., 2002).

A Tabela 17.4 sumariza os diferentes papéis de phyA, phyB e outros fotorreceptores nas várias respostas mediadas pelos fitocromos.

TABELA 17.4
Comparação das respostas de fluência muito baixa (VFLR), baixa (LFR) e irradiância alta (HIR)

Tipo de resposta	Fotorreversibilidade	Reciprocidade	Picos do espectros de ação	Fotorreceptor
VLFR	Não	Sim	Vermelho, Azul	phyA, phyE[a]
LFR	Sim	Sim	Vermelho, Verm.-Distante	phyB, phyD, phyE
HIR	Não	Não	Cultivado no escuro: verm.-distante, azul, UV-A Cultivado na luz: vermelho	Cultivado no escuro: phyA, criptocromo Cultivado na luz: phyB

[a]O phyE é necessário para a germinação da semente, mas não para outras respostas VLFR mediadas pelo phyA

Os papéis dos fitocromos C, D e E no desenvolvimento também estão emergindo

Alguns dos papéis de outros fitocromos no crescimento e desenvolvimento das plantas começaram, recentemente, a ser elucidados por meio de experimentos em plantas mutantes. Visto que tais fitocromos possuem funções que se sobrepõem àquelas de phyA e phyB, foi necessário fazer uma triagem para mutantes em *phyAB* sem mutações nas suas bases, para revelar as mutações. Por exemplo, tanto phyD como phyE ajudam a mediar as respostas de evitação da sombra — uma resposta mediada primariamente pelo phyB.

O desenvolvimento de mutantes duplos e triplos tornou possível acessar o papel relativo de cada fitocromo em uma dada resposta. Assim constatou-se que, da mesma forma que o phyB, o phyD participa na regulação do alongamento dos pecíolos foliares, bem como no tempo de floração (ver Capítulo 24). Análises similares sustentam a opinião que o phyE atua redundantemente com o phyB e phyD nestes processos, mas também atua de igual modo com o phyA e phyB na inibição do alongamento de entrenós.

Dos fitocromos de *Arabidopsis*, o phyC é o mais mal caracterizado. Contudo, embora mutantes quádruplos *phyAphyBphyDphyE* pareçam apresentar respostas normais à razão vermelho:vermelho-distante, eles possuem diferenças na expressão gênica regulada por fitocromos.

Sumarizando, phyC, phyD e phyE parecem ter papéis que são na maior parte redundantes com aqueles do phyA e phyB. Enquanto o phyB parece estar envolvido na regulação de todos os estádios de desenvolvimento, as funções dos outros fitocromos estão restritas a etapas de desenvolvimento ou a respostas específicas.

As interações dos fitocromos são importantes no início da germinação

A Figura 17.15A mostra a ação das luzes vermelha e vermelho-distante constantes absorvidas separadamente pelos sistemas phyA e phyB. A luz vermelha contínua, absorvida pelo phyB, estimula o desestiolamento, pela manutenção de altos níveis de PfrB. A luz vermelho-distante contínua, absorvida pelo PfrB, evita essa estimulação, por meio da redução da quantidade de PfrB. A estimulação do desestiolamento por phyA depende do estado fotoestacionário do fitocromo (indicado na Figura 17.15 pelas setas circulares). A luz vermelho-distante contínua estimula o desestiolamento, quando absorvida pelo sistema phyA; a luz vermelha contínua inibe esta resposta.

Os efeitos de phyA e phyB no desenvolvimento de plântulas em ambiente ensolarado em comparação com a sombra de um dossel (enriquecido com luz vermelho-distante) são mostrados na Figura 17.15B. Em ambiente aberto, enriquecido com luz vermelha, quando comparado com a sombra de um dossel, o desestiolamento é mediado principalmente pelo sistema phyB (à esquerda na figura). Uma plântula emergindo sob a sombra de um dossel, enriquecida com luz vermelho-distante, inicia o desestiolamento principalmente por meio do sistema phyA (centro). Pelo fato de o phyA ser lábil, a resposta passa a ser assumida por phyB (direita). Na mudança para phyB, o caule é liberado da inibição do crescimento (ver Figura 17.15A), permitindo uma acelerada taxa de alongamento do caule, que é parte da resposta de evitação da sombra (ver **Tópico 17.4 na Internet**).

Para uma discussão de como as plantas sentem os seus vizinhos utilizando a luz refletida, ver o **Ensaio 17.2 na Internet**.

DOMÍNIOS FUNCIONAIS DO FITOCROMO

Antes da descoberta das múltiplas formas de fitocromo, era difícil entender como um único fotorreceptor poderia regular processos tão diferentes na célula. Entretanto, a descoberta de que o fitocromo é codificado por membros de uma família multigênica, cada um com o seu próprio padrão de expressão, forneceu uma explicação alternativa mais plausível: cada resposta mediada pelo fitocromo é regulada por um fitocromo específico ou por intera-

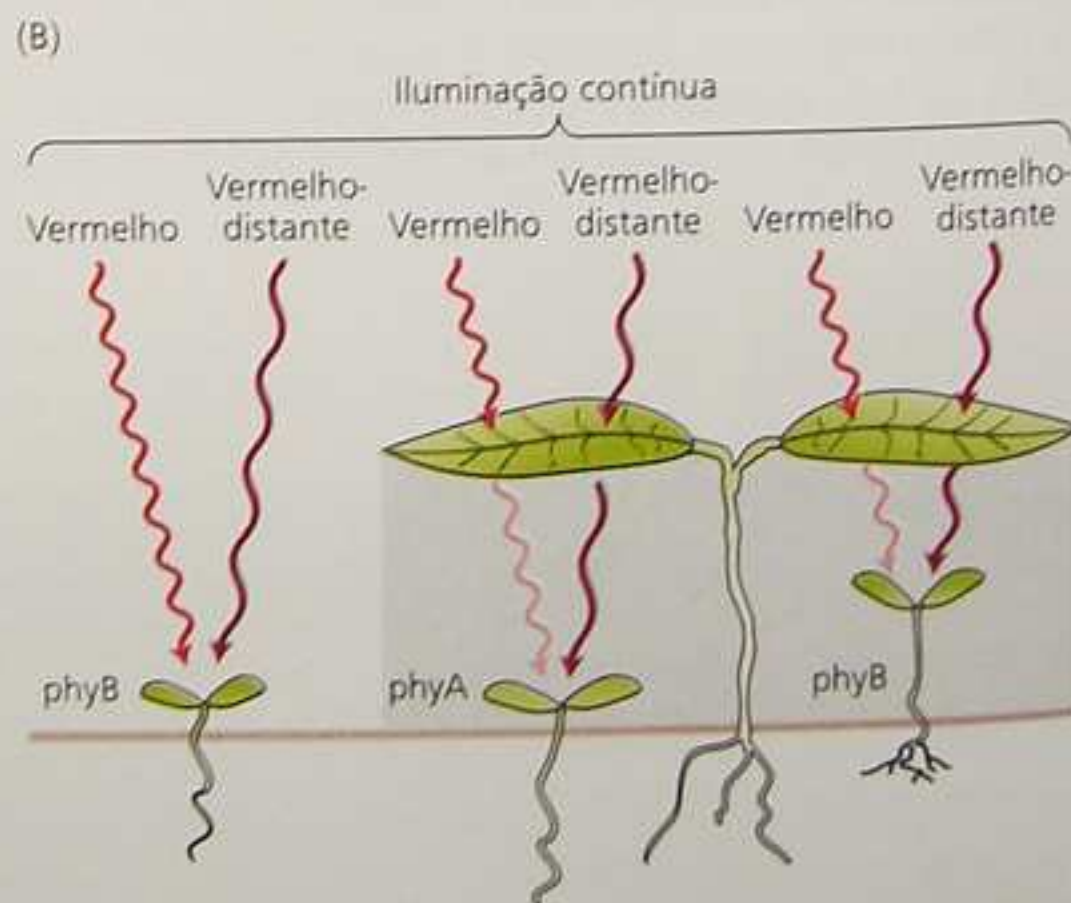
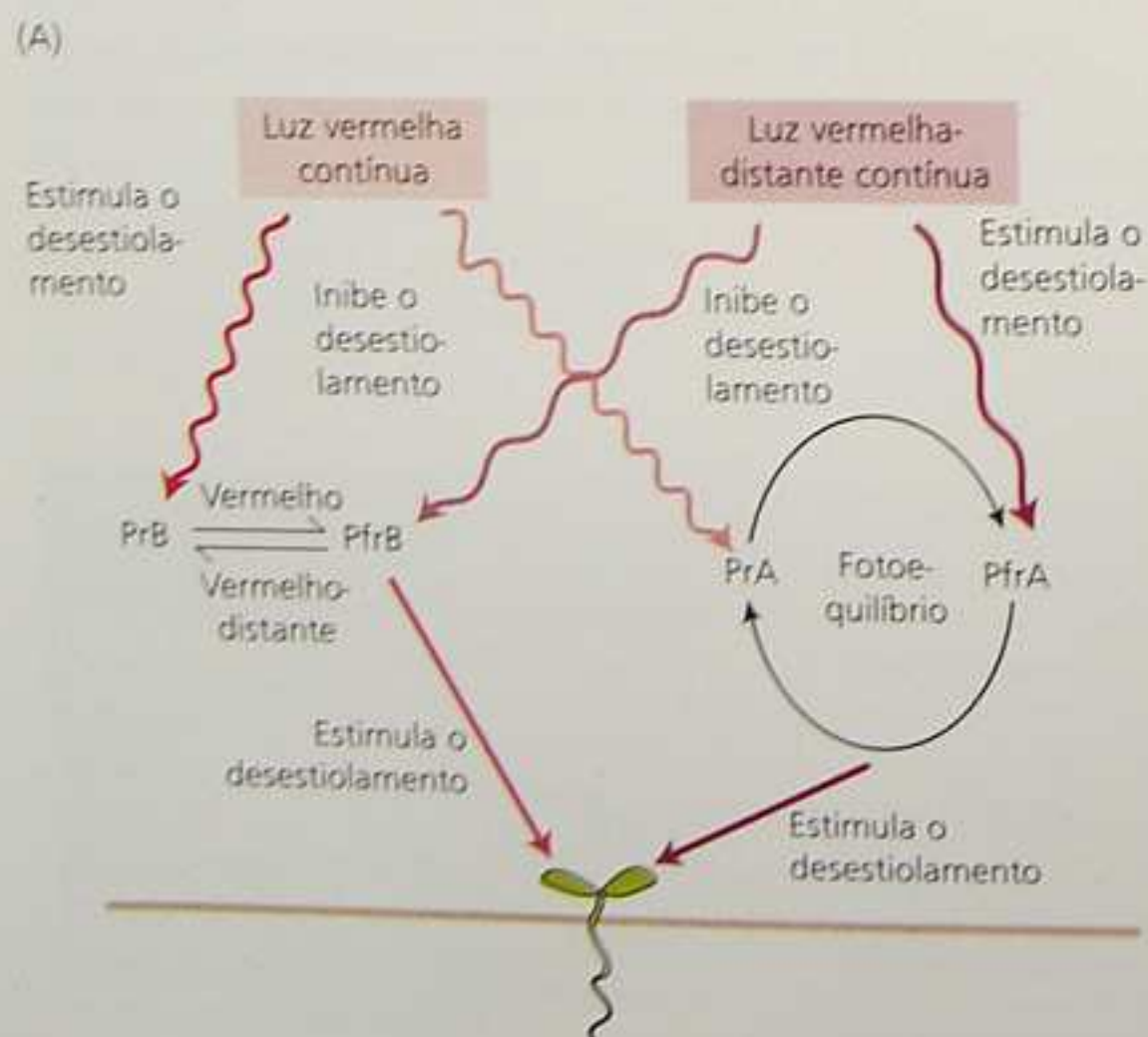



FIGURA 17.15 Papéis mutuamente antagônicos de phyA e phyB (segundo Quail e cols., 1995).

ções entre fitocromos específicos. Conforme já discutido, esta hipótese foi sustentada pelos fenótipos de mutantes deficientes em phyA ou phyB.

Como um corolário a esta hipótese, foi ainda postulado que regiões específicas das proteínas *PHY* devem ser especializadas para que possam realizar sua distintas funções. A biologia molecular fornece as ferramentas para responder estas difíceis questões. Nesta seção, será descrito o que é conhecido sobre os domínios funcionais da holoproteína do fitocromo.

Assim como as mutações, que *reduzem* a quantidade de um fitocromo em particular, produziram informações sobre sua função, as plantas geneticamente modificadas para *superexpressar* um fitocromo específico são também muito úteis. Primeiro, elas permitem uma extensão da faixa de níveis de fitocromos testáveis em relação à função. Segundo, como se verá, uma seqüência específica de fitocromos pode ser alterada e reintroduzida em uma planta normal para testar os seus efeitos fenotípicos.

Geralmente, plantas que superexpressam um gene introduzido *PHYA* ou PHYB têm um fenótipo drasticamente alterado. Essas plantas transgênicas são muitas vezes anãs, verde-escuras, devido aos níveis altos de clorofila, e mostram uma dominância apical reduzida. Tal fenótipo necessita de níveis elevados de uma holoproteína fotoativa e intacta, pois a superexpressão de uma forma modificada de fitocromo incapaz de se combinar com seu cromóforo possui um fenótipo normal. Similarmente, as plantas que expressam apenas o domínio N-terminal de cada fitocromo possuem um fenótipo normal, mesmo acumulando níveis elevados do fragmento fotoativo.

Embora a superexpressão da proteína perturbe bastante o metabolismo normal de uma célula e esteja, por este motivo, sujeita a certos artefatos, tais estudos de estrutura e função têm ajudado a construir um quadro do fitocromo como uma molécula dotada de dois domínios ligados por uma articulação: um domínio N-terminal sensível à luz no qual residem a especificidade e estabilidade luminosas, e outro, um domínio C-terminal, que contém a seqüências de transmissão de sinal (Figura 17.16).

O domínio C-terminal também contém o sítio para a formação dos dímeros do fitocromo e o sítio para a adição da ubiquitina, uma marca para degradação (para uma descrição mais detalhada dos experimentos que auxiliaram a mapear os domínios funcionais do fitocromo, ver o **Tópico 17.5 na Internet**).

MECANISMOS CELULARES E MOLECULARES

Todas as mudanças nas plantas reguladas pelo fitocromo iniciam com a absorção da luz pelo pigmento. Após a absorção da luz, as propriedades moleculares do fitocromo são alteradas, provavelmente causando a interação das seqüências de transmissão de sinal no C-terminal com um ou mais dos componentes da rota de transdução do sinal, o que, em última análise, provoca as mudanças no crescimento, desenvolvimento ou posição de um órgão (ver Tabela 17.1).

Algumas das formas de transmissão de sinal parecem interagir com múltiplas rotas de transdução de sinal; outras parecem ser relacionadas unicamente a uma rota específica. Além disso, é razoável admitir que proteínas diferentes do fitocromo utilizem conjuntos distintos de rotas de transdução de sinais.

Técnicas moleculares e bioquímicas estão ajudando a desvendar as etapas iniciais na ação do fitocromo e nas rotas de transdução de sinais que levam à respostas fisiológicas ou de desenvolvimento. Tais respostas enquadram-se em duas categorias gerais:

1. Respostas de turgor relativamente rápidas, envolvendo fluxo de íons.
2. Processos de longo prazo, mais lentos, associados com a fotomorfogênese, envolvendo alterações na expressão gênica.

Nesta seção, serão examinados os efeitos do fitocromo tanto na permeabilidade de membrana quanto na expressão gênica, assim como a possível cadeia de eventos constituintes das rotas de transdução de sinais que fazem com que esses eventos aconteçam.

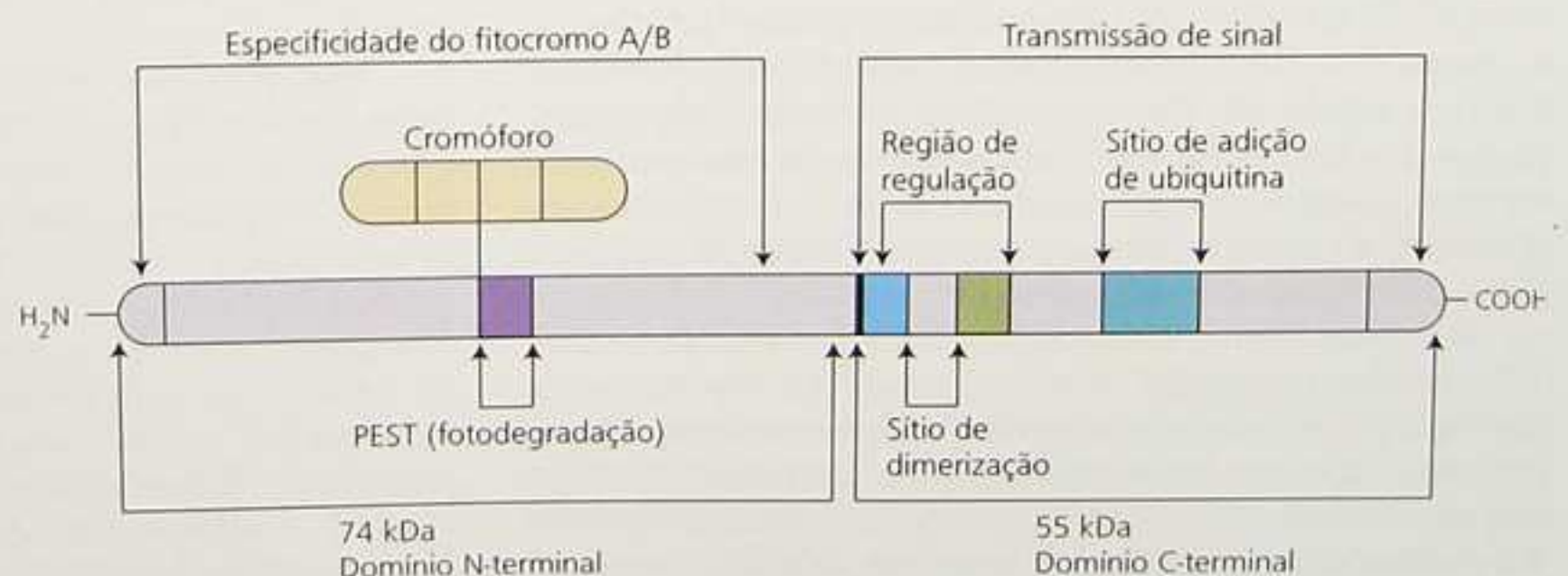



FIGURA 17.16 Diagrama esquemático da holoproteína do fitocromo, mostrando os vários domínios funcionais. O sítio de ligação do cromóforo e a seqüência PEST estes localizados no domínio N-terminal, o qual confere especificidade fotossensorial à molécula — isto é, se ela irá responder às luzes vermelha ou vermelho-distante contínuas. O domínio C-terminal contém um sítio de dimerização, um sítio para adição de ubiquitina e uma região de regulação. O domínio C-terminal transmite sinais às proteínas que atuam *downstream* do fitocromo.

O fitocormo regula os potenciais de membrana e os fluxos de íons

O fitocromo pode alterar rapidamente as propriedades das membranas. Já vimos que é necessário luz vermelha de fluência baixa antes de um período de escuro para induzir o fechamento rápido dos folíolos durante os movimentos nictinásticos e que fluxos de K^+ e Cl^- para dentro e para fora das células motoras ventrais e dorsais medeiam a resposta. Contudo, a rapidez do fechamento da folha no escuro (*lag time* de aproximadamente cinco minutos) parece excluir mecanismos baseados na expressão gênica. Em vez disso, alterações na permeabilidade das membranas e no transporte, rapidamente induzidas pelo fitocromo, parecem estar envolvidas.

Durante o fechamento dos folíolos mediados pelo fitocromo, o pH apoplástico das células motoras dorsais (as células que intumescem durante o fechamento dos folíolos) diminui, enquanto o pH apoplástico das células motoras ventrais (as células que murcham durante o fechamento dos folíolos) aumenta. Assim, a bomba de H^+ da membrana plasmática das células dorsais parece ser ativada pelo escuro (desde que o fitocromo esteja na forma Pfr) e a bomba de H^+ das células ventrais parece ser desativada sob as mesmas condições (ver Figura 17.14). Durante a abertura dos folíolos, observa-se o padrão inverso de alterações de pH apoplástico.

Foram realizados também estudos sobre a regulação pelo fitocromo dos canais de K^+ em protoplastos isolados (células sem suas paredes celulares), de células motoras dorsais e ventrais de folhas de *Samanea* (Kim e cols., 1993). Quando a concentração extracelular de K^+ foi aumentada, o K^+ entrou nos protoplastos e despolarizou o potencial da membrana somente quando os canais de K^+ estavam abertos. Quando protoplastos das células motoras dorsais e ventrais foram transferidos para escuro constante, o estado dos canais de K^+ exibiu um ritmo circadiano durante um período de incubação de 21 horas e os dois tipos de células variaram reciprocamente, como o fazem *in vivo*. Isto é, quando os canais de K^+ das células dorsais estavam abertos, os canais de K^+ das células ventrais estavam fechados e vice-versa. Assim, o ritmo circadiano dos movimentos foliares tem suas origens no ritmo circadiano da abertura dos canais de K^+.

Com base na evidência apresentada até aqui, pode-se concluir que o fitocromo provoca o fechamento dos folíolos por meio da regulação das atividades das bombas de prótons primárias e dos canais de K^+ das células motoras dorsais e ventrais. Embora o efeito seja rápido, ele não é instantâneo; portanto, é improvável que seja devido a um efeito direto do fitocromo na membrana. Em vez disso, o fitocromo atua indiretamente via uma ou mais rotas de transdução de sinais, como no caso da regulação da expressão gênica pelo fitocromo (ver a próxima seção).

Entretanto, alguns efeitos da luz vermelha e da vermelho-distante sobre o potencial de membrana são tão rápidos que o fitocromo pode também interagir diretamente com a membrana. Esta modulação rápida foi monitorada em células individuais e tem sido inferida a partir dos efeitos da luz vermelha e vermelho-distante sobre o potencial da superfície de raízes e coleóptilos de aveia (*Avena*), onde o *lag time* entre a produção de Pfr e a instalação de alterações mensuráveis no potencial é de 4,5 s para hiperpolarização.

As alterações no potencial bioelétrico de células implicam em mudanças no fluxo de íons através da membrana plasmática (ver o **Tópico 17.6 na Internet**). Estudos de isolamento de membranas fornecem evidências que uma pequena porção do fitocromo total está intimamente ligada a várias membranas de organelas.

Estas descobertas levaram alguns pesquisadores a sugerir que o fitocromo ligado à membrana representa a fração fisiologicamente ativa e que todos os efeitos do fitocromo sobre a expressão gênica são iniciados por alterações na permeabilidade das membranas. Com base na análise seqüencial, entretanto, está claro agora que o fitocromo é uma proteína hidrofílica sem domínios que atravessem a membrana. A visão corrente é que isto pode estar associado a microtúbulos localizados diretamente abaixo da membrana plasmática, pelo menos no caso da alga *Mugeotia*, como descrito no **Tópico 17.2 na Internet**.

Se o fitocromo exerce seus efeitos sobre membranas a partir de uma certa distância, não interessa quão pequena seja, há a implicação do envolvimento de um *mensageiro secundário*, sendo o cálcio um bom candidato. Rápidas alterações no cálcio livre do citosol têm sido implicadas como mensageiros secundários em várias rotas de transdução de sinal e existem evidências que o cálcio exerce um papel no movimento dos cloroplastos em *Mugeotia*.

O fitocromo regula a expressão gênica

Como sugere o termo *fotomorfogênese*, o desenvolvimento das plantas é extremamente influenciado pela luz. Os sintomas de estiolamento incluem caules delgados, folhas pequenas (em dicotiledôneas) e ausência de clorofila. A reversão completa de tais sintomas pela luz envolve grandes alterações de longo prazo no metabolismo, as quais podem ocorrer somente por mudanças na expressão gênica.

A estimulação e a repressão da transcrição pela luz pode ser muito rápida, com *lag times* tão curtos quanto cinco minutos. É possível que a expressão gênica inicial seja regulada pela ativação direta de fatores de transcrição, por uma ou mais das rotas de transdução de sinal iniciadas pelo fitocromo. Os fatores de transcrição ativados entram, então, no núcleo, onde vão estimular a transcrição de genes específicos.

Alguns destes produtos gênicos iniciais são fatores de transcrição que ativam a expressão de outros genes. A expressão dos genes iniciais, também chamados de **genes de resposta primária**, é independente da síntese de proteínas; a expressão dos genes finais, ou **genes de resposta secundária**, requer a síntese de novas proteínas.

A fotorregulação da expressão gênica tem se concentrado nos genes nucleares que codificam mensagens para as proteínas dos cloroplastos: a subunidade pequena da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) e as principais proteínas de captação de luz ligadas à clorofila *a/b*, associadas com o complexo de captação de luz do fotossistema II (proteínas LHCIIb). Essas proteínas desempenham papel importante no desenvolvimento e na aquisição da coloração verde dos cloroplastos; assim, sua regulação pelo fitocromo tem sido estudada em detalhe. Os genes para ambas as proteínas — *RBCS* e *LHCB* (também chamadas de *CAB*, em alguns estudos) — estão presentes em múltiplas cópias no genoma.

Experimentalmente, pode-se demonstrar a regulação da abundância de mRNA pelo fitocromo (p. ex., mRNAs *RBCS*), dando às plantas estioladas um breve pulso de luz vermelha ou vermelho-distante de baixa fluência, retornando as plantas para o escuro a fim de que a rota de transdução de sinal opere, e, depois, medindo a abundância de mRNAs específicos no RNA total preparado de cada grupo de plantas. Se a sua abundância for regulada pelo fito-

cromo, o mRNA estará ausente ou presente em baixos níveis em plantas estioladas, aumentando, porém, com a luz vermelha. O aumento na expressão induzido pela luz vermelha pode ser revertido por um tratamento imediato com luz vermelho-distante, apesar de essa luz, por si só, ter pouco efeito sobre a abundância do mRNA. A expressão de alguns outros genes é suprimida sob tais condições.

A estimulação da germinação de sementes de alface foi recentemente correlacionada com um aumento na forma biologicamente ativa do hormônio giberelina. A luz vermelha provoca um grande aumento na expressão do gene que codifica uma enzima-chave na rota biossintética da giberelina (Toyomasu e cols., 1998). O efeito da luz vermelha é revertido por um tratamento com luz vermelho-distante, indicativo da ação do fitocromo. Uma vez que a giberelina pode substituir a luz vermelha na promoção da germinação de sementes de alface, faz parecer que o fitocromo promove a germinação de sementes pelo aumento da biossíntese do hormônio. As giberelina são discutidas em detalhe no Capítulo 20.

Para uma discussão mais detalhada, ver o **Tópico 17.7 na Internet**.

O fitocromo e o ritmo circadiano regulam o *LHCB*

Um fator de transcrição relacionado ao MYB, cujo nível de mRNA aumenta rapidamente quando se transfere *Arabidopsis* do escuro para a luz, está envolvido na expressão dos genes de *LHCB* mediada pelo fitocromo (Figura 17.17) (para informação sobre o MYB, ver **Capítulo 14 na Internet**).

Esse fator de transcrição parece se ligar ao promotor de certos genes do *LHCB* e regular sua transcrição, a qual, conforme mostra a Figura 17.17, ocorre mais tarde do que o aumento na proteína relacionada ao MYB (Wang e cols., 1997). O gene que codifica a proteína relacionada ao MYB é, portanto, provavelmente um gene de resposta primária, e o gene do *LHCB* propriamente dito pode ser um gene de resposta secundária.

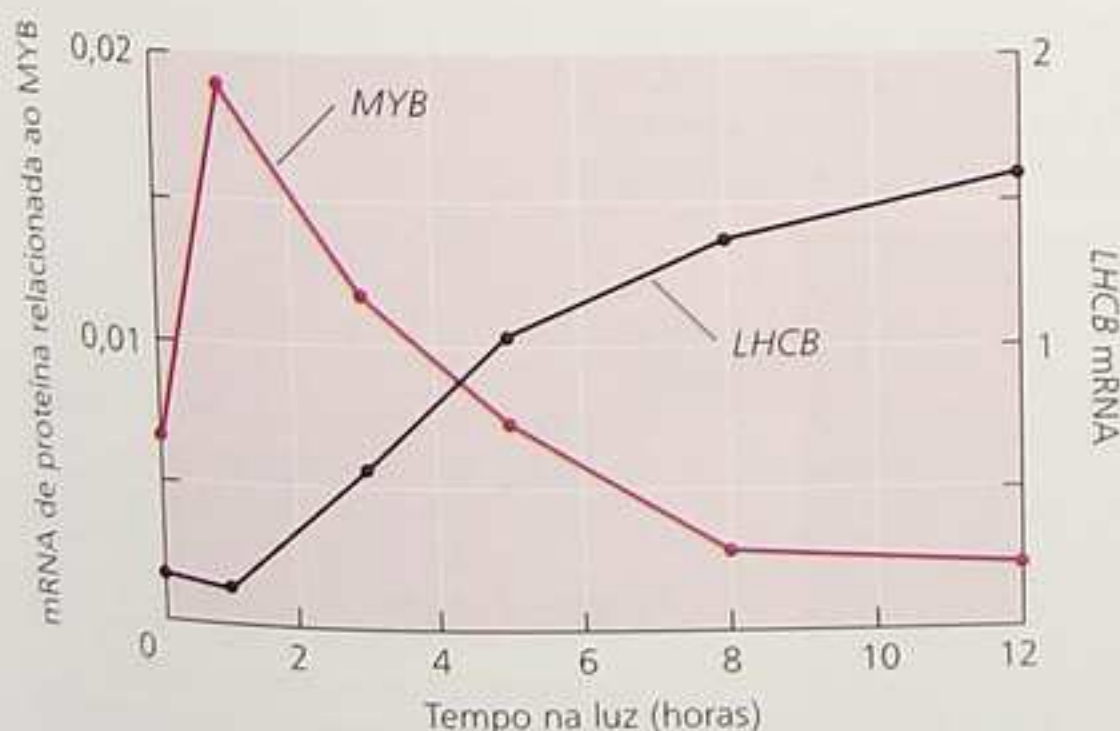



FIGURA 17.17 Progressão temporal da indução da transcrição. A cinética da indução de transcritos para um fator de transcrição relacionado ao MYB (MYB) e da proteína ligada à clorofila *a/b* de captação de luz (LHCB) em *Arabidopsis*, após a transferência das plântulas do escuro para a luz branca contínua (segundo Wang e cols., 1997).

Trabalhos recentes indicam que esta proteína relacionada ao MYB, agora conhecida como associada 1 do relógio circadiano (CCA1, do inglês *c*ircadian *c*lock *a*ssociated *1*), também tem papel na regulação circadiana da expressão gênica do *LHCB*. Uma segunda, porém distinta, proteína relacionada ao MYB — alongamento tardio do hipocótilo (LHY; do inglês, *l*ate elongated *hy*pocotyl) — também foi identificada como um gene potencial do relógio. A expressão de *CCA1* e *LHY* oscila com um ritmo circadiano. A expressão constitutiva de *CCA1* abole vários ritmos circadianos e suprime tanto a expressão de *CCA1* como de *LHY*. Quando o gene *CCA1* sofre mutação, de modo que não haja produção de proteína funcional, é afetada a regulação circadiana e pelo fitocromo de quatro genes, incluindo *LHCB*. Essas observações sugerem que *CCA1* e *LHY* estão associados com o relógio circadiano.

Uma proteína quinase (CK2) pode interagir com CCA1 e fosforilá-la. A quinase CK2 é uma proteína com múltiplas subunidades com atividade de serina/treonina quinase. *In vitro*, foi demonstrado que a subunidade regulatória da CK2 (CKB3) interage com CCA1 e a fosforila. Mutações na CKB3 também perturbam a atividade da CK2 e, por sua vez, alteram o período da expressão rítmica de CCA1. Essas mutações afetam muitos *outputs* do relógio, da expressão gênica ao tempo de florescimento, sugerindo que a CK2 está envolvida na regulação do relógio circadiano via interações com a CCA1 (Sugano e cols., 1999).

O oscilador circadiano envolve um *loop de feedback* negativo transcricional

Os osciladores circadianos de cianobactérias (*Synechococcus*), fungos (*Neurospora crassa*), insetos (*Drosophila melanogaster*) e ratos (*Mus musculus*) já foram elucidados. Nesses quatro organismos, o oscilador é composto por vários "genes do relógio" envolvidos em um *loop de feedback* negativo de transcrição-tradução.

Até agora, três dos principais genes do relógio foram identificados em *Arabidopsis*: *TOC1*, *LHY* e *CCA1*. As proteínas resultantes desses genes são todas proteínas de regulação. *TOC1* não está relacionado aos genes do relógio de outros organismos, sugerindo que o oscilador vegetal seja único.

Segundo um modelo recente (Alabadi e cols., 2001), a luz e a proteína reguladora TOC1 ativam a expressão de *LHY* e *CCA1* ao amanhecer (Figura 17.18). O aumento em LHY e em CCA1 reprimem a expressão do gene *TOC1*. Visto que TOC1 é um regulador positivo dos genes *LHY* e *CCA1*, reprimir a expressão de *TOC1* causa uma redução progressiva nos níveis de LHY e CCA1, os quais atingem seus níveis mínimos ao final do dia. Assim que os níveis de LHY e CCA1 declinam, a expressão do gene *TOC1* é liberada da inibição. TOC1 atinge seu máximo ao final do dia, quando LHY e CCA1 estão em seus mínimos. TOC1, então, estimula direta ou indiretamente a expressão de *LHY* e *CCA1*, e o ciclo reinicia.

As duas proteínas reguladoras MYB — LHY e CCA1 — têm função dupla. Além de servir como componentes do oscilador, elas regulam a expressão de outros genes, tais como *LHCB* e outros "genes matutinos", e reprimem os genes expressos à noite. A luz atua para reforçar o efeito do gene *TOC1* na promoção da expressão de *LHY* e *CCA1*. Este reforço representa o mecanismo fundamental de *sincronização*. Outras proteínas, tais como a quinase CK2, afetam a atividade de *CCA1* e, assim, regulam o relógio. O fitocromo e o fotorreceptor de luz azul CRY2 (ver Capítulo 18) medeiam os efeitos das luzes vermelha e azul, respectivamente.

As seqüências reguladoras controlam a transcrição regulada pela luz

As seqüências reguladoras atuantes no *cis*, necessárias para que ocorra a regulação pela luz da expressão gênica, têm sido extensivamente estudadas. A maioria dos promotores eucariontes para genes que codificam proteínas compreende duas regiões funcionalmente distintas: uma seqüência curta que determina o sítio de início da transcrição (a **caixa TATA**, assim denominada em função de seus nucleotídeos mais abundantes) e as seqüências *upstream*, chamadas de **elementos reguladores atuantes no *cis***, que regulam a quantidade e o padrão da transcrição (ver **Capítulo 14 na Internet**). Essas seqüências reguladoras ligam proteínas específicas, chamadas de **fatores atuantes no *trans***, responsáveis pela modulação da atividade dos fatores de transcrição gerais que se juntam ao redor do sítio inicial de transcrição com a RNA polimerase II.

Em geral, o quadro que aparece para os promotores vegetais regulados pela luz é similar ao de outros genes eucariontes: uma coleção de elementos modulares cujo número, posição, seqüências laterais e atividades de ligação podem levar a uma grande variedade de padrões de transcrição. Não existe uma seqüência de DNA ou de proteína de ligação comum a todos os genes regulados pelo fitocromo.

Em princípio, pode parecer paradoxal que genes regulados pela luz possuam uma faixa tão ampla de elementos, cuja combinação de quaisquer elementos pode resultar em uma expressão regulada pela luz. Entretanto, tal quantidade de seqüências permite a regulação diferencial, específica para o tecido e para a luz, de muitos genes, através da ação de múltiplos fotorreceptores (para uma discussão mais abrangente, ver o **Tópico 17.8 na Internet**).

Fatores de regulação. Como pode ser esperado, essa gama variada de seqüências reguladoras do fitocromo pode se ligar a uma variedade de fatores de transcrição. Pelo menos 50 desses fatores de regulação já foram identificados em estudos recentes, com o uso de triagens genéticas e moleculares (Tepperman e cols., 2001).

Embora algumas das rotas de sinalização de atuação inicial sejam específicas para o phyA ou phyB, fica claro que rotas de sinalização de atuação tardia, comuns a múltiplos fotorreceptores, devem ser utilizadas, pois qualidades diferentes de luz podem desencadear a mesma resposta (Chory e Wu, 2001).

Por exemplo, o SPA1 é um sinalizador intermediário específico para phyA, que atua como um repressor da fotomorfogênese dependente da luz, em plântulas de *Arabidopsis* (Hoecker e Quail, 2001). A proteína SPA1 tem um domínio protéico tipo mola espiralada (do inglês, *coiled-coil protein domain*), que a permite interagir com um outro fator, COP1 (fotomorfogênese constitutiva 1; do inglês, *c*onstitutive *p*hotomorphogenesis 1), que atua *downstream* de ambos phyA e phyB. A proteína COP1 foi identificada na triagem para mutantes constitutivos da fotomorfogênese, que produziu vários outros fatores com atuação *downstream* de fotorreceptores (ver **Tópico 17.9 na Internet**). A COP1 é uma E3 ubiquitina ligase que busca outras proteínas para destruição pelo proteassomo 26S (ver **Capítulo 14 na Internet**).

As funções de muitos desses fatores são provavelmente moduladas pela ação de HY5, uma proteína identificada pela primeira vez por meio de triagem para hipocótilos longos, já discutido neste capítulo. HY5 é um fator básico de transcrição de leucina, tipo *zipper*, que está sempre localizado no núcleo (ver **Capítulo 14 na Internet**). O HY5 liga-se ao motivo *G-box* (do inglês, *G-box motif*) de múltiplos promotores induzíveis pela luz e é necessário para otimizar a expressão dos genes correspondentes. No escuro, HY5 é ubiquitinado pelo COP1 e degradado pelo complexo proteassomo 26S.

O fitocromo se move para o núcleo

Tem sido um antigo mistério saber como o fitocromo pode atuar no núcleo, quando ele está aparentemente localizado no ci-

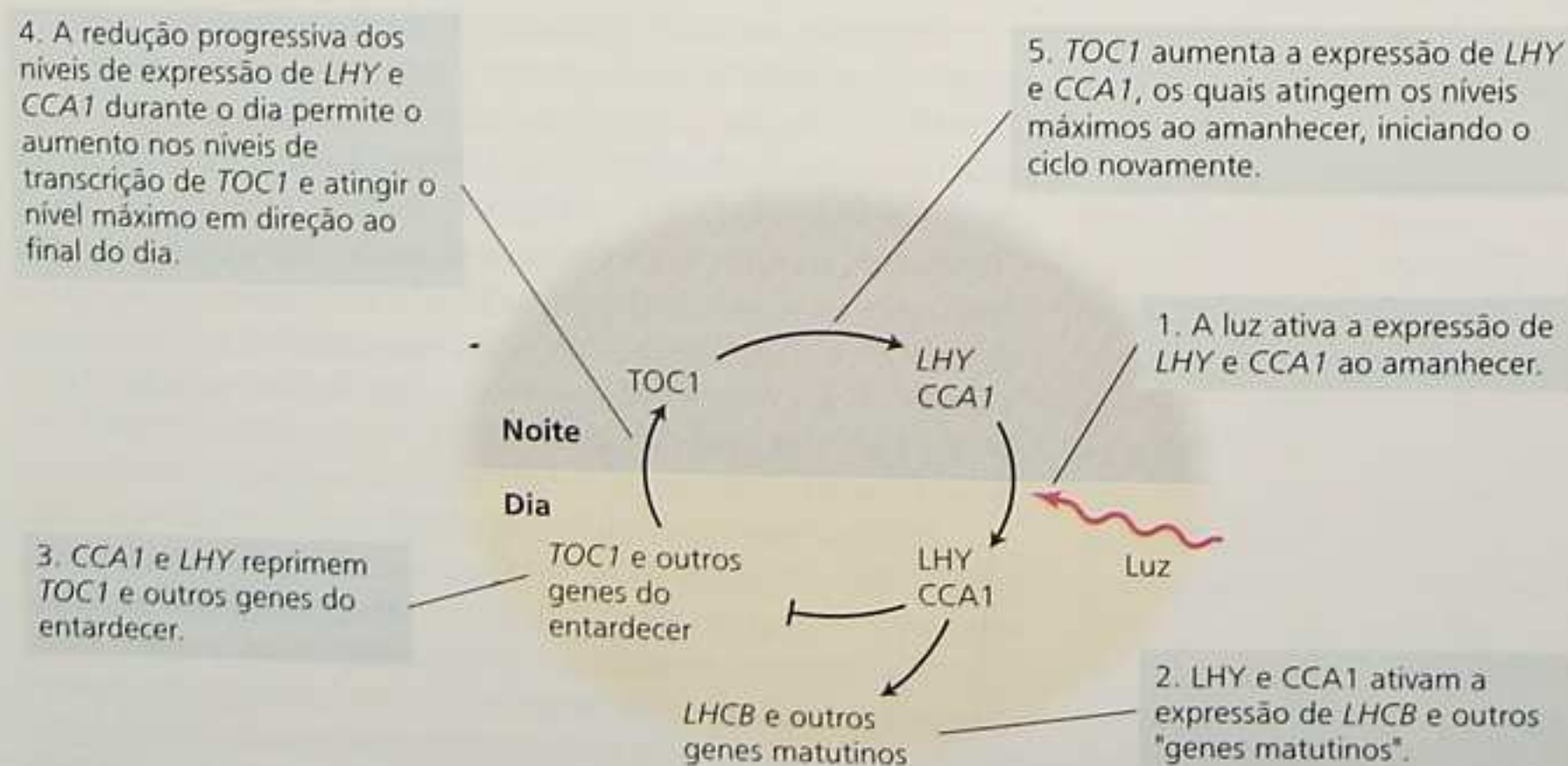



FIGURA 17.18 Modelo do oscilador circadiano, mostrando as interações hipotéticas entre os genes *TOC1* e os genes *MYB*, *LHY* e *CCA1*. A luz atua ao amanhecer para aumentar a expressão de *LHY* e *CCA1*. *LHY* e *CCA1* atuam para regular outros genes diurnos e do anoitecer.

tosol. Pesquisas recentes finalmente abriram a caixa-preta que existia entre o fitocromo e a expressão gênica. A descoberta mais surpreendente é que, em alguns casos, o próprio fitocromo move-se para o núcleo de uma maneira dependente da luz.

A detecção desse movimento dependeu da habilidade de fundir o fitocromo a um marcador visível, a **proteína verde fluorescente** (GFP; do inglês, *green fluorescent protein*), que pode ser ativada por luz de comprimento de onda apropriado, iluminando células vegetais. Uma grande vantagem das fusões de GFP é que elas podem ser visualizadas em células vivas, tornando possível seguir os processos dinâmicos que ocorrem dentro da célula sob a lente de um microscópio.

Tanto o phyA-GFP como o phyB-GFP mostram importação para o núcleo ativada pela luz (Figura 17.19) (Sakamoto e Nagatani, 1996; Sharma, 2001). A fusão de phyB move-se para o núcleo somente na forma Pfr; esse transporte é lento, levando várias horas para a mobilização completa. Por outro lado, o phyA-GFP pode se mover nas formas Pfr ou Pr, desde que primeiramente tenha passado pela forma Pfr. O movimento de phyA-GFP é muito mais rápido do que o de phyB-GFP, necessitando apenas 15 minutos por volta.

O mais satisfatório é a observação que o transporte de phyB-GFP é promovido pela luz vermelha e inibido pela luz vermelho-distante, enquanto o transporte de phyA-GFP é máximo sob luz vermelho distante contínua. Além disso, a translocação de phyB para o núcleo está sob controle circadiano, como seria de esperar, uma vez que o phyB regula a expressão de genes regulados pelo relógio. Estas condições de luz são conhecidas por serem responsáveis pela ativação de phyA e phyB e seriam consistentes com suas atividades no núcleo.

O que acontece quando Pfr move-se para o núcleo? Até hoje, foram identificadas duas proteínas que interagem com o fitocromo, embora, provavelmente, haja alvos adicionais. A primeira, **fator 3 de interação com o fitocromo** (**PIF3**, do inglês *Phytochrome Interacting Factor 3*), reage com a extremidade C-terminal do phyA ou phyB. Entretanto, ele reage preferencialmente com a proteína phyB completa, de uma maneira dependente de luz, e acredita-se que seja um parceiro funcional de reação primária para esse fitocromo.

Embora a sua função exata ainda não seja ainda conhecida, o PIF3 parece ser um fator de transcrição que se liga a um elemento específico nos promotores vegetais, o motivo G-box, que confere a estes genes a regulação pela luz. Também é sabido que o phyB, na forma Pfr, pode formar um complexo com o PIF3 ligado ao seu DNA-alvo. Conseqüentemente, emerge um quadro, em que alguns genes regulados pelo fitocromo são ativados diretamente pelo movimento de phyB, na forma Pfr, para o núcleo. Uma vez no núcleo, o phyB interage com os fatores de transcrição, tais como o PIF3. Um modelo para a ativação direta da expressão gênica pelo phyB no núcleo é mostrado na Figura 17.20.

O fitocromo atua através de rotas múltiplas de transdução de sinal

Utilizando abordagens bioquímicas, pesquisadores demonstraram que a sinalização envolve vários mecanismos diferentes, incluindo as proteínas G, CA^{2+} e a fosforilação. As evidências para cada um desses mecanismos serão consideradas separadamente.

Proteínas G e cálcio. Rotas de sinalização bem caracterizadas em outros sistemas (p. ex., fusão em levedos) freqüentemente incluem **proteínas G** (que são revistas no **Capítulo 14 na Internet**). Estes complexos protéicos estão normalmente associados à membranas, possuem três subunidades diferentes e ligam GTP ou GDP a uma subunidade. A hidrólise de GTP a GDP é necessária para a regulação da função da proteína G. As seqüências que codificam as proteínas G já foram clonadas em vegetais, indicando que este tipo de sistema está presente nesses organismos. Uma das maneiras pelas quais a função das proteínas G pode ser testada é o tratamento das células com compostos químicos, os quais ativam ou inibem a capacidades desse complexo se ligar ou quebrar GTP.

Experimentos com microinjeções (ver **Tópico 17.10 na Internet**) indicam que a sinalização pelo fitocromo pode ocorrer em células isoladas, não necessitando de luz após a ativação do fitocromo. Pelo menos uma proteína G pode funcionar *downstream* a partir do fitocromo. Após a etapa com a proteína G, existem pelo menos duas rotas alternativas. Uma delas — a expressão gênica e o desenvolvi-

(A) (B)

10 μm

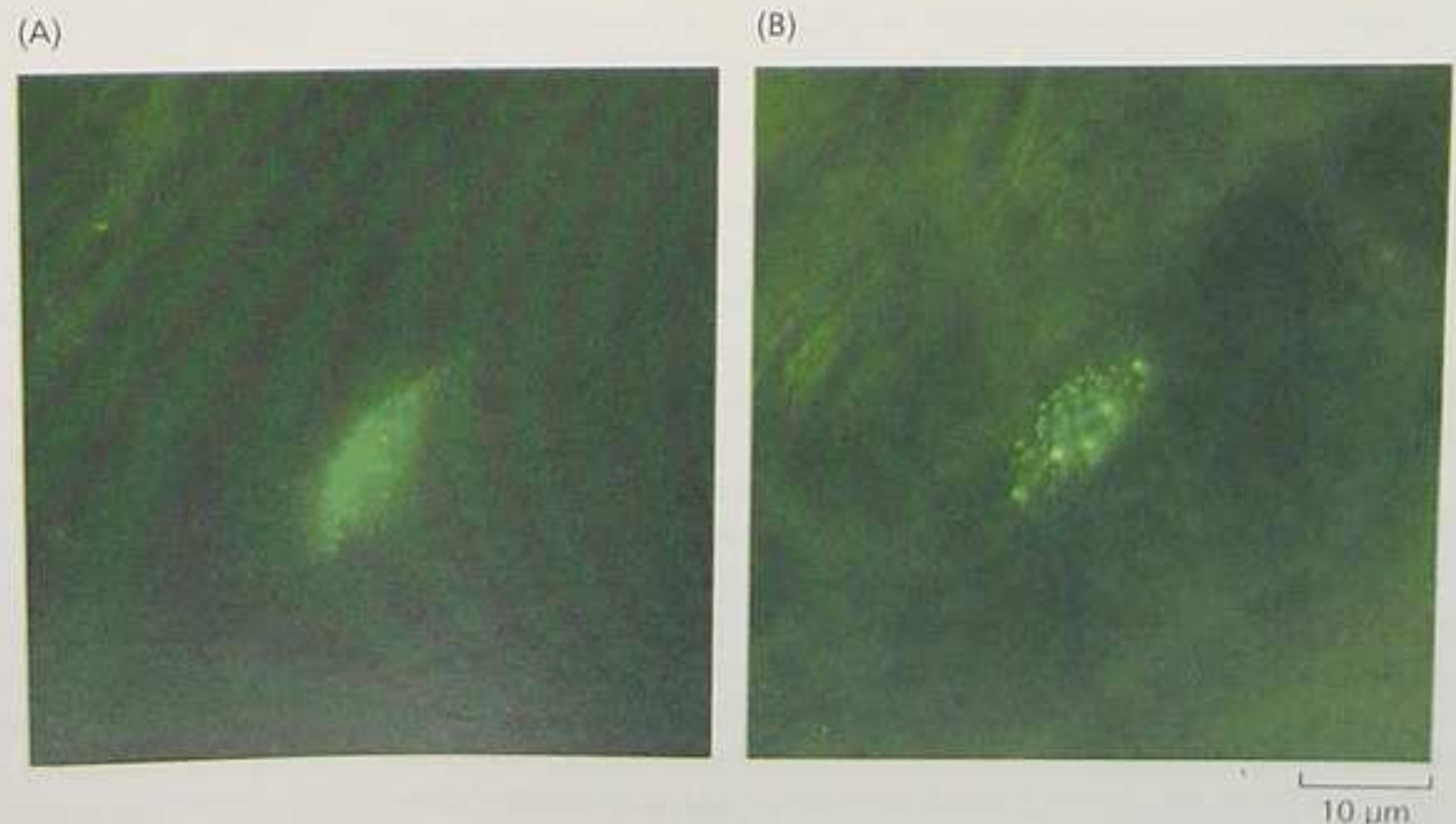



FIGURA 17.19 Localização nuclear das proteínas de fusão phy-GFP, em células epidérmicas de hipocótilos de *Arabidopsis*. Células transgênicas de *Arabidopsis*, expressando phyA-GFP (esquerda) ou phyB-GFP (direita), são observadas sob um microscópio de fluorescência. Somente os núcleos são visíveis. As plantas foram colocadas sob luz vermelho-distante contínua (esquerda) ou luz branca (direita), para induzir a acumulação no núcleo. São observados pequeno pontos verdes brilhantes dentro do núcleo (do inglês, *speckles*), cujo significado é desconhecido (Yamaguchi e cols., 1999, cedidas por A. Nagatani).

1. PhyB é sintetizado no citoplasma na forma inativa PrB.

2. Quando convertido à forma ativa PfrB pela luz vermelha, ele se move para o núcleo.

3. PfrB liga-se ao dímero do fator de transcrição, PIF3, o qual está ligado aos elementos G-*BOX* do promotor do gene *MYB*.

4. Quando da adição do complexo de pré-iniciação (PIC), a transcrição dos genes *MYB*, incluindo *CCA1* e *LHY*, é ativada.

5. Os fatores de transcrição MYB, por sua vez, ativam a transcrição de outros genes, tais como *LHCB*.

FIGURA 17.20 Regulação direta da expressão gênica pelo transporte de phyB para o núcleo (Quail, 2000).

mento dos cloroplastos — necessita de Ca^{2+} e calmodulina; a outra — síntese de antocianinas — é independente do Ca^{2+}.

As rotas alternativas podem ser distinguidas, ademais, pelos elementos-alvo reguladores atuantes no *cis* e o sinalizador intermediário utilizado. Por muitos anos, é sabido que, em animais, tanto o AMP cíclico (cAMP) e o GMP cíclico (cGMP) são importantes intermediários nas rotas de sinalização induzidas por hormônios ou pela luz (ver **Capítulo 14 na Internet**). Embora seja difícil demonstrar a presença de cAMP em plantas, a presença do cGMP em tecidos vegetais é bem conhecida. De fato, estudos recentes demonstraram que o cGMP serve como um segundo mensageiro na atuação do fitocromo.

Contudo, o papel da cascata de proteínas G nas plantas ainda é controverso. Alguns genes-chaves (p. ex., guanililato ciclase) ainda não foram identificados em genomas vegetais e os níveis de cGMP são muito baixos nesses organismos. Por outro lado, estudos com inibidores têm sugerido o cGMP como um mensageiro secundário para os hormônios giberelina (ver Capítulo 20) e ácido abscísico (ver Capítulo 23). Assim, embora a controvérsia, permanece a possibilidade de uma função para o cGMP na sinalização realizada pelo fitocromo.

Fosforilação. A evidência de um papel potencial da fosforilação na atuação do fitocromo veio, em primeiro lugar, da regulação da fosforilação de proteínas pela luz vermelha e da ligação dos fatores de transcrição, dependentes da fosforilação, aos promotores de genes, regulados pelo fitocromo. Em algumas das preparações altamente purificadas de fitocromo foram detectadas também atividades de quinase.

As **quinases** são enzimas que possuem a capacidade de transferir grupamentos fosfato do ATP para os aminoácidos, tais como serina ou tirosina, tanto nelas próprias como em outras proteínas. As quinases são freqüentemente encontradas em rotas de transdução de sinais, nas quais a adição ou a remoção de grupamentos fosfato regula a atividade enzimática.

O fitocromo é hoje reconhecido como uma proteína quinase. A origem evolutiva do fitocromo é muito antiga, precedendo a aparição dos eucariontes. Os fitocromos bacterianos são quinases de histidina dependentes da luz, atuantes como **proteínas sensoriais**, que fosforilam correspondentes às proteínas **reguladoras de resposta** (Figura 17.21A) (ver também o **Capítulo 14 na Internet** e o **Tópico 17.11 na Internet**).

Entretanto, embora os fitocromos das plantas superiores tenham alguma homologia com os domínios de quinase, eles não funcionam como quinases de histidina. Em vez disso, eles são serina/treonina quinases. Ademais, versões recombinantes de fitocromos de plantas superiores e de algas foram evidenciadas como quinases moduladas pela luz e pelo cromóforo, que podem fosforilar a si próprios e a outras proteínas (Figura 17.21B) (Sharma, 2001).

Pelo menos um alvo potencial é uma proteína citosólica chamada de **substrato 1 da quinase do fitocromo** ou **PKS1** (do inglês, *p*hytochrome *k*inase *s*ubstrate *1*), que pode aceitar um fosfato de

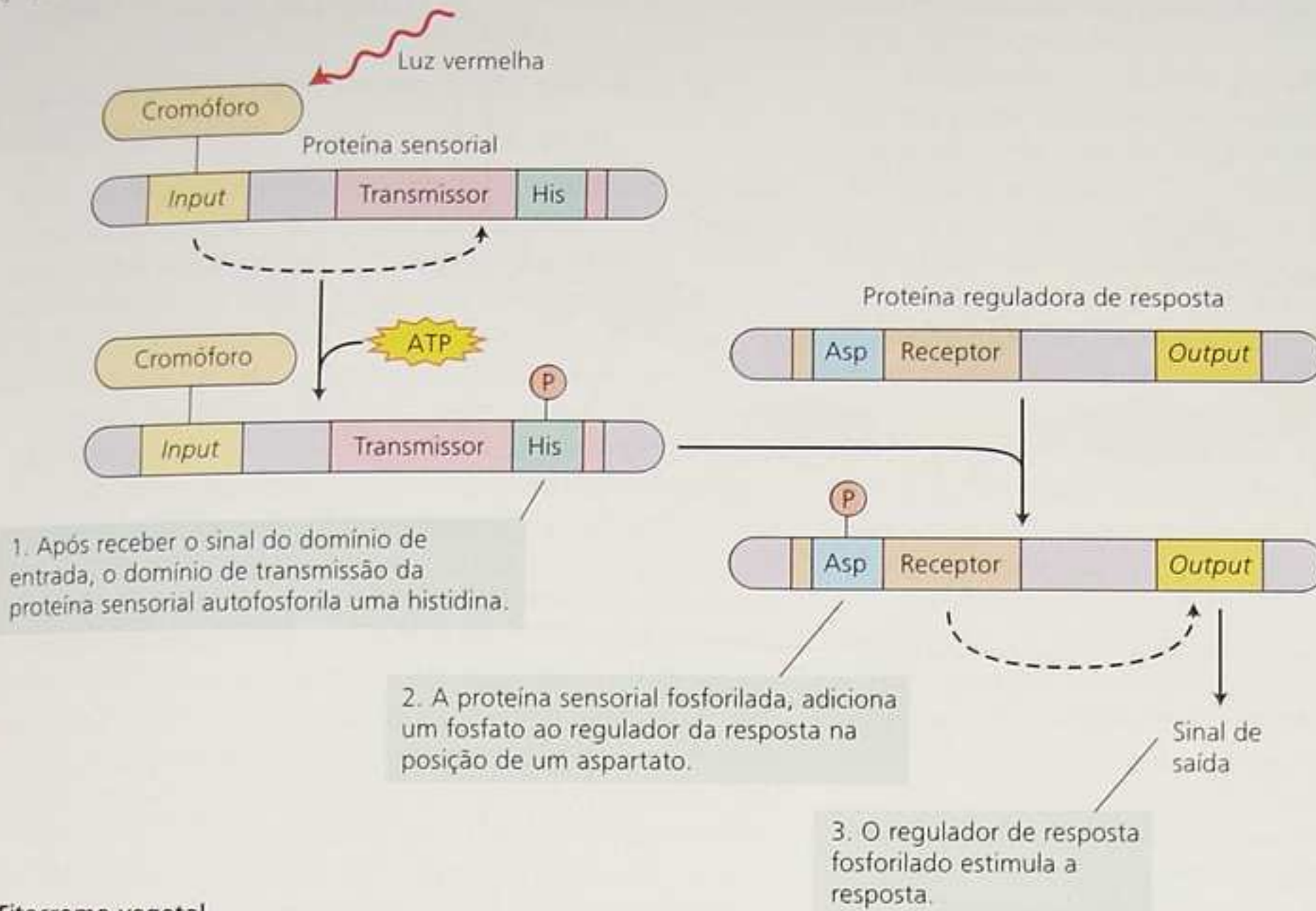
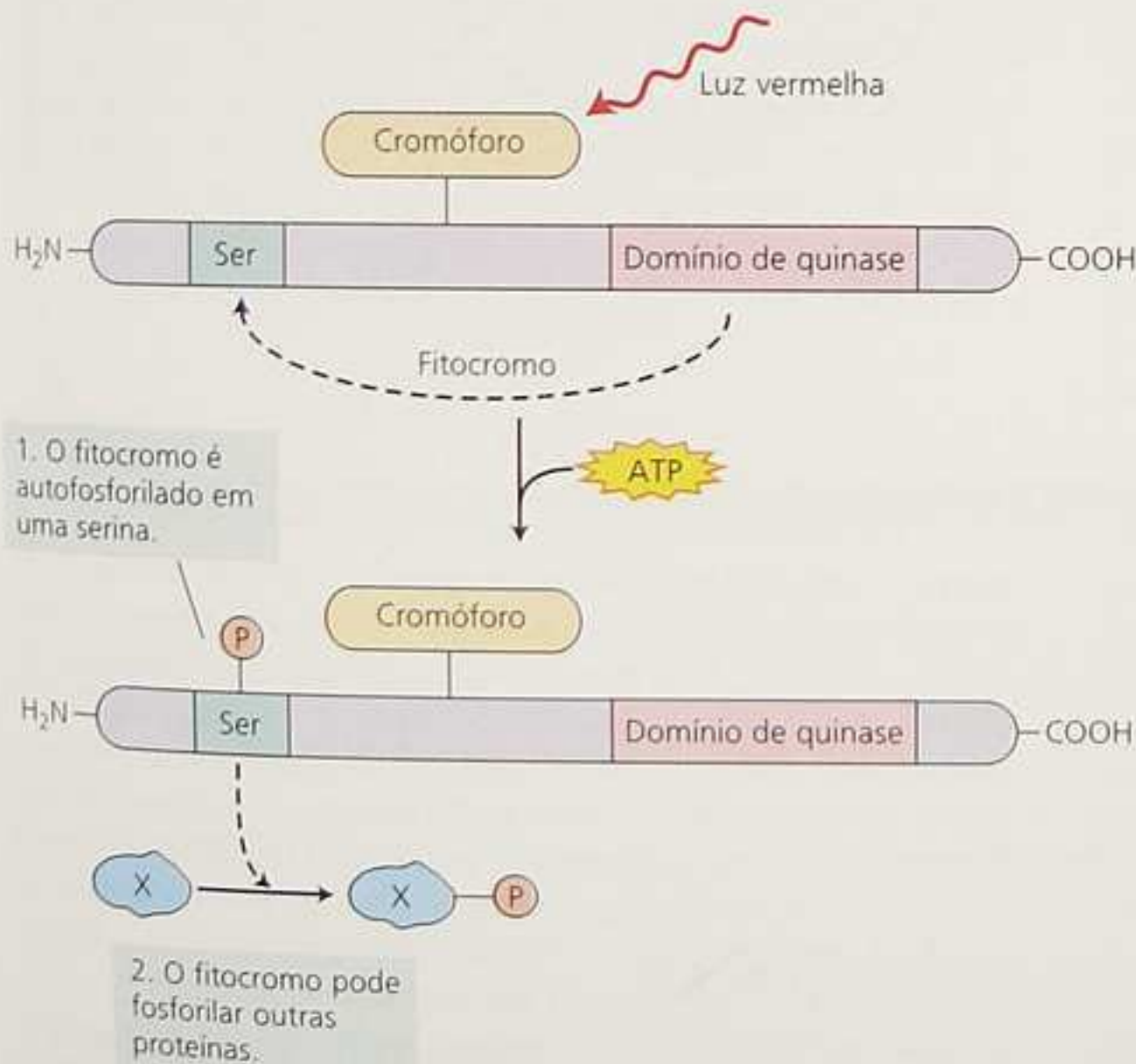



FIGURA 17.21 O fitocromo é uma proteína quinase autofosforilante. (A) O fitocromo bacteriano é um exemplo de um sistema de sinalização de dois componentes, no qual o fitocromo atua como uma proteína sensorial que fosforila um regulador de resposta (ver **Capítulo 14 na Internet**). (B) O fitocromo de plantas é uma serina/treonina quinase autofosforilante que pode fosforilar outras proteínas (X).

phyA. A fosforilação ocorre nas serinas e, em menor extensão, nas treoninas. A fosforilação do PKS1 é regulada pelo fitocromo, tanto em tubos de ensaio quanto nas plantas, com Pfr possuindo um nível de atividade duas vezes mais elevado do que Pr. A superexpressão do PKS1 em plantas transgênicas sugere que ele possa funcionar como regulador negativo dos eventos mediados por phyB (Fankhauser e cols., 1999).

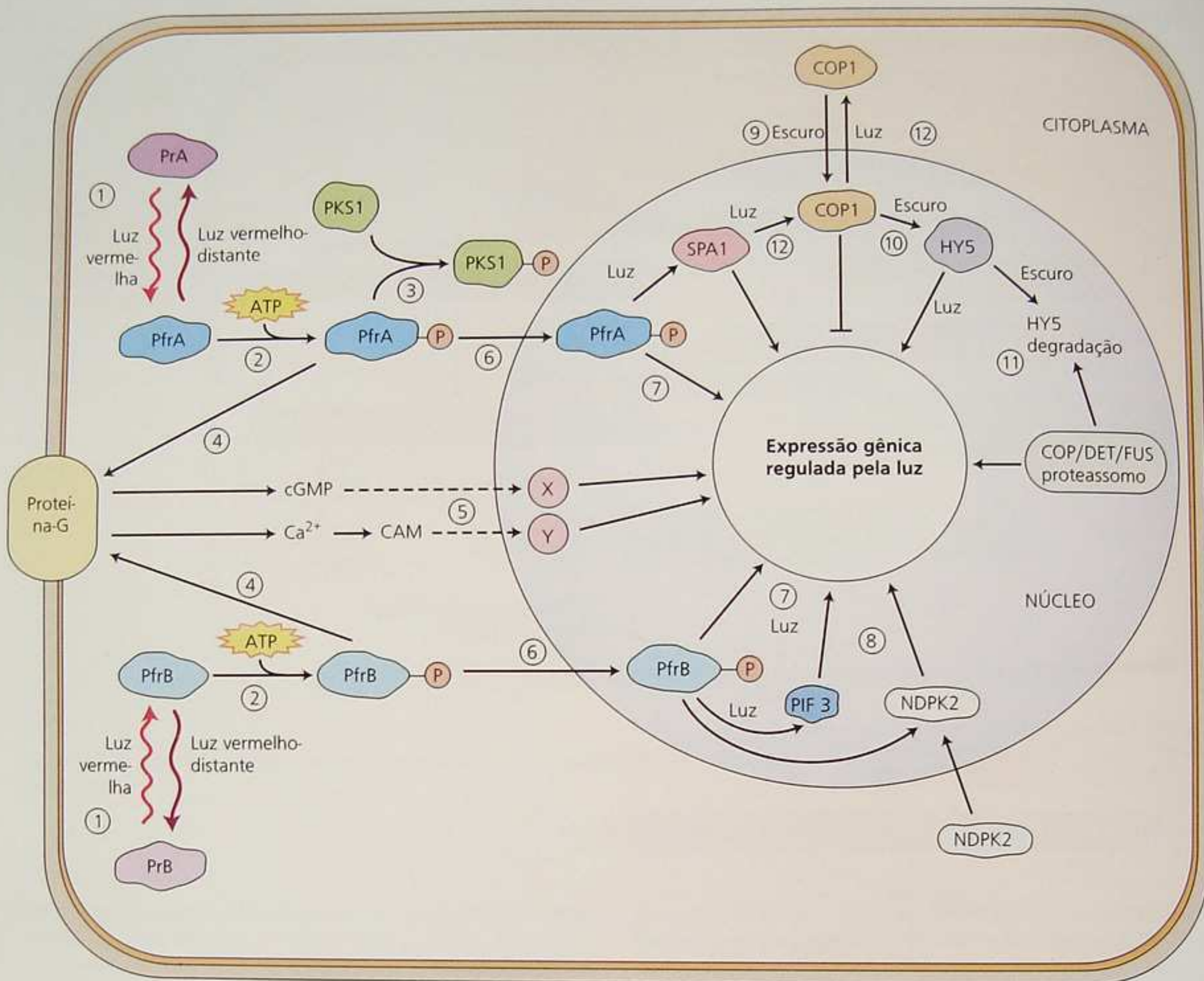
Outra quinase associada com o fitocromo é a **nucleosídeo difosfato quinase 2 (NDPK2**; do inglês, *n*ucleoside *d*iphosphate *k*inase 2). Constatou-se que o fitocromo A interage com esta proteína e a sua atividade de quinase é aumentada em cerca de duas vezes, quando phyA está ligado na forma Pfr. Visto que a proteína NDPK2 é encontrada no núcleo e no citosol, a localização de seu sítio primário de ação ainda não está esclarecida.

1. A luz vermelha converte PrA e PrB em suas formas Pfr.
2. As formas Pfr do fitocromo phyA e phyB podem se autofosforilar.
3. PfrA ativado fosforila a substrato 1 fitocromo quinase (PKS1).
4. PfrA e PfrB ativados podem interagir com proteínas-G.
5. cGMP, calmodulina (CAM) e cálcio (Ca^{2+}) podem ativar fatores de transcrição (X e Y).
6. PfrA e PfrB ativados entram no núcleo.
7. PfrA e PfrB podem regular a transcrição diretamente ou por meio da interação com o fator 3 de interação com o fitocromo (PIF3).
8. Nucleosídeo difosfato quinase 2 (NDPK2) é ativada por PfrB.
9. No escuro, COP1 entra no núcleo e reprime os genes regulados pela luz.
10. No escuro, COP1, uma ligase E3, ubiquitina HY5.
11. No escuro, HY5 é degradado com o auxílio do complexo proteassômico COP/DET/FUS.
12. Na luz, COP1 interage diretamente com SPA1 e é exportado para o citoplasma.

FIGURA 17.22 Síntese dos fatores conhecidos envolvidos na expressão gênica regulada por fitocromos. É provável que rotas combinadas e fitocromo-específicas sejam descobertas, na medida que mais sinalizadores intermediários vão sendo identificados (Sharma, 2001).

Um sumário das possíveis rotas de sinalização e de regulação do fitocromo é mostrado na Figura 17.22.

A ação do fitocromo pode ser modulada pela ação de outros fotorreceptores

O recente isolamento dos genes codificadores do criptocromo e dos fotorreceptores de fototropinas (ver Capítulo 18), que medeiam as respostas reguladas pela luz azul, tornou possível analisar se tais fotorreceptores têm outras funções sobrepostas (Chory e Wu, 2001). Tal possibilidade foi suspeitada tendo em vista que mutações no gene *CRY2* do criptocromo levaram a um atraso do florescimento sob luz branca contínua, sabendo-se também que o fitocromo exerce um controle sobre o momento do florescimento.

Em *Arabidopsis*, o tratamento com luz azul ou vermelho-distante contínuas leva à promoção do florescimento, o qual é inibido pela luz vermelha. A luz vermelho-distante atua por intermédio do phyA e o efeito antagônico da luz vermelha dá-se pela ação do phyB. Poderia ser esperado que o mutante *cry2* tivesse o florescimento atrasado, pois o mesmo é promovido pela luz azul. Entretanto, os mutantes *cry2* florescem ao mesmo tempo, no tipo selvagem mantido sob luz azul contínua ou sob luz vermelha contínua. O atraso é observado somente se as luzes azul e vermelha são fornecidas juntas, razão pela qual, o cry2 funciona, provavelmente, como promotor do florescimento na luz azul, reprimindo a atuação do phyB.

Experimentos adicionais confirmam que o outro criptocromo, cry1, também interage com os fitocromos. Os dois, cry1 e cry2, interagem com o phyA *in vitro* e podem ser fosforilados de uma maneira dependente de phyA. A ocorrência da fosforilação de cry1 também foi demonstrada *in vivo*, em uma forma dependente da luz vermelha. De fato, a importância de criptocromos como reguladores do desenvolvimento tem sido enfatizada por sua subseqüente descoberta em sistemas animais, como ratos e humanos.

RESUMO

O termo *fotomorfogênese* refere-se aos efeitos drásticos da luz no desenvolvimento da planta e no metabolismo celular. A luz vermelha exerce a influência mais forte e seus efeitos são muitas vezes revertidos pela luz vermelho-distante.

O fitocromo é o pigmento envolvido na maioria dos fenômenos fotomorfogênicos. O fitocromo ocorre em duas formas: uma que absorve a luz vermelha (Pr) e outra que absorve a luz vermelho-distante (Pfr). O fitocromo é sintetizado no escuro na forma Pr. A absorção da luz vermelha por Pr o converte na forma Pfr; a absorção de luz vermelho distante por Pfr o converte em Pr. Entretanto, os espectros de absorção das duas formas sobrepõem-se na região espectral do vermelho, levando a um equilíbrio das duas formas, que é chamado de estado fotoestacionário.

O Pfr é considerado a forma ativa, que dá origem à resposta fisiológica; contudo, o Pr, particularmente o Pr cíclico, participa das respostas mediadas por phyA. Além da luz, outros fatores regulam o estado de equilíbrio de Pfr, incluindo o nível de expressão da proteína e sua estabilidade na forma Pfr.

O fitocromo é um dímero protéico grande composto por duas subunidades equivalentes. O monômero possui uma massa molecular de aproximadamente 125 kDa e é ligado covalentemente a uma molécula de cromóforo, um tetrapirrol de cadeia aberta chamado de fitocromobilina.

O fitocromo é codificado por uma família de genes divergentes que geram dois tipos de proteínas: Tipo I e Tipo II. A Tipo I, codificada pelo gene *PHYA*, é abundante em tecidos estiolados. No entanto, o fitocromo Tipo I está presente em baixos níveis em plantas cultivadas à luz, por causa da sua instabilidade na forma Pfr, da supressão da transcrição de seu próprio gene mediada por phyA e da instabilidade de seu mRNA. O fitocromo Tipo II (codificado pelos genes *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* e *PHYE*) está presente em baixos níveis em plantas cultivadas tanto à luz quanto no escuro, pois seus genes são expressos constitutivamente em baixos níveis e a proteína é estável na forma Pfr.

Estudos espectrofotométricos e imunológicos indicam que os fitocromos estão concentrados em regiões meristemáticas. PhyA e phyB movem-se para o núcleo na conversão para as formas Pfr.

As repostas do fitocromo são classificadas em: de fluência muito baixa, de fluência baixa e de irradiância alta (VLFRs, LFRs e HIRs). Estes três tipos de respostas diferem não somente em suas exigências de fluência, mas também em outros parâmetros, tais como seus tempos de escape, espectro de ação e fotorreversibilidade. O fitocromo B desempenha um importante papel na detecção da sombra em plantas adaptadas a níveis altos de radiação solar; o fitocromo A tem um papel mais limitado, mediando a HIR no vermelho distante durante o início do surgimento da cor verde (do inglês, *early greening*). Os fitocromos C, D e E também possuem funções específicas durante fases limitadas do desenvolvimento, sendo tais funções em parte redundantes com aquelas de phyA e phyB.

É sabido que o fitocromo regula a transcrição de inúmeros genes. Muitos dos genes envolvidos na pigmentação verde, tais como aqueles codificados no núcleo para a subunidade pequena da rubisco e a proteína de ligação da clorofila *a/b* para o complexo de absorção de luz, são regulados transcricionalmente pelo fitrocromo (tanto phyA como phyB).

O fitocromo também reprime a transcrição de vários genes, incluindo o *PHYA*. Acredita-se que a ativação ou a repressão desses genes seja mediada por fatores de transcrição gerais, que se ligam aos elementos reguladores atuantes no *cis* dentro das regiões promotoras destes genes de uma forma combinada. Em alguns casos, o fitocromo na forma Pfr interage diretamente com estes fatores. Estes fatores de transcrição, por sua vez, estão ligados à ação do fitocromo por uma complexa série de rotas de transdução de sinais, envolvendo proteínas COP e DET, quinases, GMP cíclico, proteínas G triméricas, Ca^{2+} e calmodulina.

A descoberta e a caracterização do fitocromo bacteriano sugere que o fitocromo das plantas com flores evoluiu de uma quinase de histidina bacteriana que participa de rotas de sinalização de dois componentes.

Além do efeitos de longo prazo envolvendo alterações na expressão gênica, o fitocromo induz uma variedade de respostas rápidas, incluindo a rotação dos cloroplastos na alga *Mougeotia*, o fechamento foliar durante a nictinastia e alterações no potencial de membrana. Estas repostas envolvem alterações rápidas nas propriedades das membranas. A visão atual é que mesmo tais efeitos rápidos dos fitocromos envolvem rotas de sinalização.

Material da Internet

Tópicos da Internet

17.1 A estrutura dos fitocromos
É descrita aqui a purificação e a caracterização do fitocromo como um homodímero.

17.2 *Mougeotia*: um cloroplasto diferente
Experimentos com irradiação em microfeixes foram utilizados para localizar o fitocromo nessa alga verde filamentosa.

17.3 O fitocromo e as repostas de irradiância alta
Experimentos com dois comprimentos de onda ajudaram a demonstrar o papel do fitocromo em HIRs.

17.4 Interações dos fitocromos durante a germinação
São descritas aqui as interações entre o phyA e o phyB durante a germinação.

17.5 Domínios funcionais do fitocromo
A superexpressão do fitocromo tem sido utilizada para caracterizar os seus domínios funcionais.

17.6 Efeitos do fitocromo sobre o fluxo de íons
O fitocromo regula o fluxo de íons através das membranas, pela alteração da atividade dos canais iônicos e da bomba de prótons da membrana plasmática.

17.7 Regulação da expressão gênica pelo fitocromo
As evidências mostram que o fitocromo regula a expressão gênica da transcrição.

17.8 A regulação da transcrição pelas seqüências atuantes no *Cis*
Os elementos de resposta do fitocromo são descritos brevemente.

17.9 Genes que reprimem a fotomorfogênese
Mais informação é fornecida sobre genes tipos *COP* e *DET* que regulam negativamente a fotomorfogênese.

17.10 Os papéis das proteínas G e do cálcio nas respostas do fitocromo
As evidências sugerem que as proteínas-G e o cálcio participam da ação dos fitocromos.

17.11 As origens do fitocromo como um receptor bacteriano de dois componentes
A descoberta do fitocromo bacteriano levou à identificação do fitocromo como uma proteína quinase.

Ensaios da Internet

17.1 Acordado por um *flash* de luz solar
Quando colocadas em um ambiente de solo apropriado, as sementes adquirem uma extraordinária sensibilidade à luz, de forma que a germinação pode ser estimulada por uma exposição à luz solar de menos do que 1s durante os processos de cultivo do solo.

17.2 Conheça seu vizinho por intermédio do fitocromo
As plantas podem detectar a proximidade das plantas vizinhas através da percepção pelo fitocromo da razão R:FR da luz refletida e produzir alterações morfológicas adaptativas antes que sejam sombreadas pelos potenciais competidores.

Referências bibliográficas

Adam, E., Szell, M., Szekeres, M., Schaefer, E., and Nagy, F. (1994) The developmental and tissue-specific expression of tobacco phytochrome-A genes. Plant J. 6: 283-293.

Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Mas, P., and Kay, S. A. (2001) Reciprocal regulation between TOC1 and *LHY*/ CCAI within the Arabidopsis circadian clock. *Science* 293; 880-883.

Andel, F., Hasson, K. C., Gai, F., Anfinrud, P. A., and Mathies, R. A. (1997) Femtosecond time-resolved spectroscopy of the primary photochemistry of phytochrome. *Biospectroscopy* 3:421-433.

Beggs, C. J., Holmes, M. G., Jabben, M., and Schaefer, E. (1980) Action spectra for the inhibition of hypocotyl growth by continuous irradiation in light- and dark-grown Sinapis alba L. seedlings. *Plant Physiol.* 66:615-618.

Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H., and Toole, V. K. (1952) A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 38: 662-666.

Briggs, W. R., Mandoli, D. F., Shinkle, J. R., Kaufman, L. S., Watson, J. C., and Thompson, W. F. (1984) Phytochrome regulation of plant development at the whole plant, physiological, and molecular levels. In *Sensory Perception and Transduction in Aneural Organisms*, G. Colombetti, F. Lenci, and P-S. Song, eds., Plenum, New York, pp. 265-280.

Butler, W. L., Norris, K. H., Siegelman, H. W., and Hendricks, S. B. (1959) Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photosensitive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 45:1703-1708.

Chory, J., and Wu, D. (2001) Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiol.* 125: 77-80.

Fankhauser, C., Yeh, K.-C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D., and Chory, J. (1999) PKSl, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis. *Science* 284: 1539-1541.

Flint, L. H. (1936) The action of radiation of specific wave-lengths in relation to the germination of light-sensitive lettuce seed. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 8: 1-1.

Furuya, M. (1993) Phytochromes: Their molecular species, gene families and functions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 617-645.

Galston, A. (1994) *Life Processes of Plants.* Scientific American Library, New York.

Goosey L., Palecanda, L., and Sharrock, R. A. (1997) Differential patterns of expression of the Arabidopsis *PHYB, PHYD* and PHYE phytochrome genes. *Plant Physiol.* 115: 959-969.

Goto, N., Yamamoto, K. T., and Watanabe, M. (1993) Action spectra for inhibition of hypocotyl growth of wild-type plants and of the *hy2* long-hypocotyl mutants of Arabidopsis thaliana L. *Photochem. Photobiol.* 57: 867-871.

Hartmann, K. M. (1967) Ein Wirkungsspecktrum der Photomorphogenese unter Hochenergiebedingungen and seine Interpretation auf der Basis des Phytochroms (Hypokotylwachstumshemmung bei Lactuca sativa L.). *Z. Naturforsch.* 22b:1172-1175.

Hennig, L., Stoddart, W. M., Dieterle, M., Whitelam, G. C., and Schafer, E. (2002) Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128: 194-200.

Hoecker, U., and Quail, P. H. (2001) The phytochrome A-specific signaling intermediate SPAT interacts directly with COPT, a constitutive repressor of light signaling in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 276: 38173-38178.

Kendrick, R. E., and Frankland, B. (1983) *Phytochrome and Plant Growth*, 2nd ed. Edward Arnold, London.

Kim, H. Y, Cote, G. G., and Crain, R. C. (1993) Potassium channels in Samanea-Saman protoplasts controlled by phytochrome and the biological clock. *Science* 260: 960-962.

Li, L., and Lagarias, J. C. (1992) Phytochrome assembly-Defining chromophore structural requirements for covalent attachment and photoreversibility. *J. Biol. Chem.* 267: 19204-19210.

Mandoli, D. F., and Briggs, W. R. (1984) Fiber optics in plants. *Sci. Am.* 251:90-98.

Mathews, S., and Sharrock, R. A. (1997) Phytochrome gene diversity. *Plant Cell Environ.* 20: 666-671.

Millar, A. J., Carre, I. A., Strayer, C. A., Chua, N.-H., and Kay S. A. (1995) Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. *Science* 267: 1161-1163.

Morgan, D. C., and Smith, H. (1978) Simulated sunflecks have large, rapid effects on plant stem extension. *Nature* 273: 534-536.

Morgan, D. C., and Smith, H. (1979) A systematic relationship between phytochrome-controlled development and species habitat, for plants grown in simulated natural irradiation. *Planta* 145: 253-258.

Nakasako, M., Wada, M., Tokutomi, S., Yamamoto, K. T., Sakai, J., Kataoka, M., Tokunaga, F., and Furuya, M. (1990) Quaternary structure of pea phytochrome I dimer studied with small angle X-ray scattering and rotary-shadowing electron microscopy. *Photochem. Photobiol.* 52: 3-12.

Parks, B. M., and Spalding, E. P (1999) Sequential and coordinated action of phytochromes A and B during *Arabidopsis* stem growth revealed by kinetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14142-14146.

Quail, P H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y., and Wagner, D. (1995) Phytochrome: Photosensory perception and signal transduction. *Science* 268: 675-680.

Quail, P H. (2000) Phytochrome-interacting factors. *Seminars in Cell & Devel. Biol.* 11: 457-466.

Sakamoto, K., and Nagatani, A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* 10: 859-868.

Sharma, R. (2001) Phytochrome: A serine kinase illuminates the nucleus! *Current Science* 80: 178-188.

Sharrock, R. A. and Quail, P H. (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana:* Structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3:1745-1757.

Shinomura, T., Nagatani, A., Hanzawa, H., Kubota, M., Watanabe, M., and Furuya, M. (1996) Action spectra for phytochrome Aand B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8129-8133.

Shropshire, W., Jr., Klein, W. H., and Elstad, V B. (1961) Action spectra of photomorphogenic induction and photoinactivation of germination in *Arabidopsis thaliana. Plant Cell Physiol.* 2: 63-69.

Smith, H. (1974) *Phytochrome and Photomorphogenesis: An Introduction to the Photocontrol of Plant Development*. McGraw-Hill, London.

Smith, H. (1982) Light quality photoperception and plant strategy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:481-518.

Smith, H., and Whitelam, G. C. (1997) The shade avoidance syndrome: Multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20: 840-844.

Somers, D. E., and Quail, P H. (1995) Temporal and spatial expression patterns of PHYAand PHYB genes in *Arabidopsis. Plant J.* 7: 413-127.

Sugano, S., Andronis, C., Ong, M. S., Green, R. M., and Tobin, E. M. (1999) The protein kinase CK2 is involved in regulation of circadian rhythms in *Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12362-12366.

Strayer, C., Oyama T., Schultz T. E, Raman, R., Somer, D. E., Mas, P, Panda, S., Kreps, J. A., and Kay, S. A. (2001) Cloning of the *Arabidopsis* clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science* 289: 768-771.

Tepperman J. M., Zhu, T., Chang, H. S., Wang, X., and Quail P H. (2001) Multiple transcription factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9437-9442.

Thiimmler, F., Dufner, M., Kreisl, P, and Dittrich, P (1992) Molecular cloning of a novel phytochrome gene of the moss *Ceratodon purpureus* which encodes a putative light-regulated protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 20:1003-1017.

Tokutomi, S., Nakasako, M., Sakai J., Kataoka M. Yamamoto K. T., Wada, M., Tokunaga, F., and Furuya, M. (1989) A model for the dimeric molecular structure of phytochrome based on small angle x-ray scattering. *FEBS Lett.* 247: 139-142.

Toyomasu T. Kawaide, H., Mitsuhashi, W., Inoue, Y. and Kamiya, Y. (1998) Phytochrome regulates gibberellin biosynthesis during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 118: 1517-1523.

Vierstra, R. D. (1994) Phytochrome degradation. In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Martinus Nijhoff, Dordrecht, Netherlands, pp. 141-162.

Vierstra, R. D., and Quail, P. H. (1983) Purification and initial characterization of 124-kilodalton phytochrome from *Avena. Biochemistry* 22: 2498-2505.

Wang, Z.-Y, Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong., M. S., and Tobin, E. M. (1997) A MYB-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis Lheb gene. Plant Cell* 9: 491-507.

Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay S. A., and Nagatani, A. (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis. J. Cell Biol.* 145: 437-145.

Capítulo

18 Respostas à luz azul: movimentos estomáticos e morfogênese

SABE-SE QUE ALGUNS ramos de plantas colocados junto à janela crescem em direção à fonte de luz. Essa reação, chamada de *fototropismo*, constitui um exemplo de como as plantas alteram seu padrão de crescimento em resposta à direção da radiação incidente, o que é intrinsecamente diferente da captura da luz pela fotossíntese. Na fotossíntese, a planta captura a luz e a converte em energia química (ver Capítulos 7 e 8). O fototropismo, ao contrário, é um exemplo do uso da luz como um *sinal ambiental*. Existem duas famílias principais de respostas das plantas aos sinais da luz: as respostas do fitocromo, que foram tratadas no Capítulo 17, e aquelas **à luz azul.**

Algumas das respostas à luz azul foram introduzidas no Capítulo 9 – por exemplo, o movimento dos cloroplastos dentro das células em resposta ao fluxo de fótons incidentes e o acompanhamento do sol (*sun tracking*) pelas folhas. Assim como na família de respostas do fitocromo, há inúmeras reações das plantas à luz azul. Além do fototropismo, elas incluem a inibição do alongamento do hipocótilo, a estimulação da síntese de clorofilas e carotenóides, a ativação da expressão de genes, os movimentos estomáticos, a fototaxia (o movimento de organismos unicelulares móveis, tais como algas e bactérias, no sentido da luz ou no sentido oposto a ela), o aumento da respiração e a captação de ânions em algas (Senger, 1984). As respostas à luz azul foram descritas em plantas superiores, algas, pteridófitos, fungos e procariontes.

Algumas outras respostas, tais como os eventos elétricos que ocorrem na membrana plasmática, podem ser detectadas segundos após a irradiação por luz azul. As respostas metabólicas ou morfogenéticas mais complexas, como a biossíntese de pigmentos estimulada pela luz azul no fungo *Neurospora* ou a ramificação na alga *Vaucheria*, podem necessitar de minutos, horas ou até mesmo dias (Horwitz, 1994).

Os leitores podem ser confundidos pelas diferentes formas de denominar as respostas dos fitocromos e a luz azul. As primeiras são identificadas por um fotorreceptor específico (fitocromo), enquanto as últimas pela região da luz azul do espectro visível. No caso do fitocromo, várias de suas propriedades espectroscópicas e bioquímicas, em particular a reversibilidade vermelho/vermelho-distante, tornaram possível sua rápida identificação; centenas de respostas fotobiológicas das plantas podem ser claramente atribuídas ao fotorreceptor fitocromo (ver Capítulo 17).

Por outro lado, a espectroscopia das respostas à luz azul é complexa. Tanto as clorofilas quanto os fitocromos absorvem luz azul (400 a 500 nm) do espectro visível, assim como outros cromóforos além de alguns aminoácidos, tais como triptofano, absorvem luz na região do ultravioleta (250 - 400 nm). Como, então, pode-se distinguir respostas específicas à luz azul? Um importante critério de identificação é que nas respostas específicas à luz azul, esta não pode ser substituída por tratamentos com luz vermelha e não há reversibilidade vermelho/vermelho-distante. As luzes vermelha ou vermelho-distante seriam efetivas, se a fotossíntese ou o fitocromo estivessem envolvidos.

Outra distinção-chave é que *muitas das respostas à luz azul das plantas superiores partilham um espectro de ação característico*. Lembre-se do Capítulo 7, no qual o espectro de ação é um gráfico da magnitude da reposta à luz observada em função dos comprimentos de onda (ver o **Tópico 7.1 na Internet** para uma detalhada discussão sobre espectroscopia e espectro de ação). O espectro de ação da resposta pode ser comparado aos *espectros de absorção* dos possíveis fotorreceptores. Uma correspondência próxima entre os espectros de ação e a absorção fornece uma forte indicação de que o pigmento em questão é o fotorreceptor que medeia a resposta à luz em estudo (ver Figura 7.8).

Os espectros de ação para o fototropismo estimulado pela luz, movimentos estomáticos, inibição do alongamento do hipocótilo e outras respostas-chave à luz azul partilham uma estrutura fina característica tipo "três dedos", na região dos 400 a 500 nm (Figura 18.1), que não é observada em espectros para respostas à luz mediadas pela fotossíntese, pelo fitocromo ou por outros fotorreceptores (Cosgrove, 1994).

Neste capítulo, serão descritas as respostas representativas à luz azul em plantas: o fototropismo, a inibição do alongamento do caule e os movimentos estomáticos. As respostas estomáticas à luz azul serão discutidas em detalhe, em decorrência da importância dos estômatos nas trocas gasosas das folhas (ver Capítulo 9), assim como nas aclimatações e adaptações das plantas ao seu ambiente. Serão igualmente discutidos os fotorreceptores da luz azul e a cascata de transdução do sinal que liga a percepção à luz com a expressão final da percepção da luz azul no organismo.

FIGURA 18.1 Espectro de ação para o fototropismo estimulado pela luz azul, em coleóptilos de aveia. Um espectro de ação mostra a relação entre uma resposta biológica e os comprimentos de onda da luz absorvida. O padrão de "três dedos" na região dos 400 a 500 nm é característico de respostas específicas à luz azul (Thimann e Curry, 1960).

A FOTOFISIOLOGIA DAS RESPOSTAS À LUZ AZUL

Sinais de luz azul são utilizados pela planta em muitas respostas, permitindo-lhes sentir a presença da luz e sua direção. Esta seção descreve as principais alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas associadas com as típicas respostas à luz azul.

A luz azul estimula o crescimento assimétrico e a curvatura

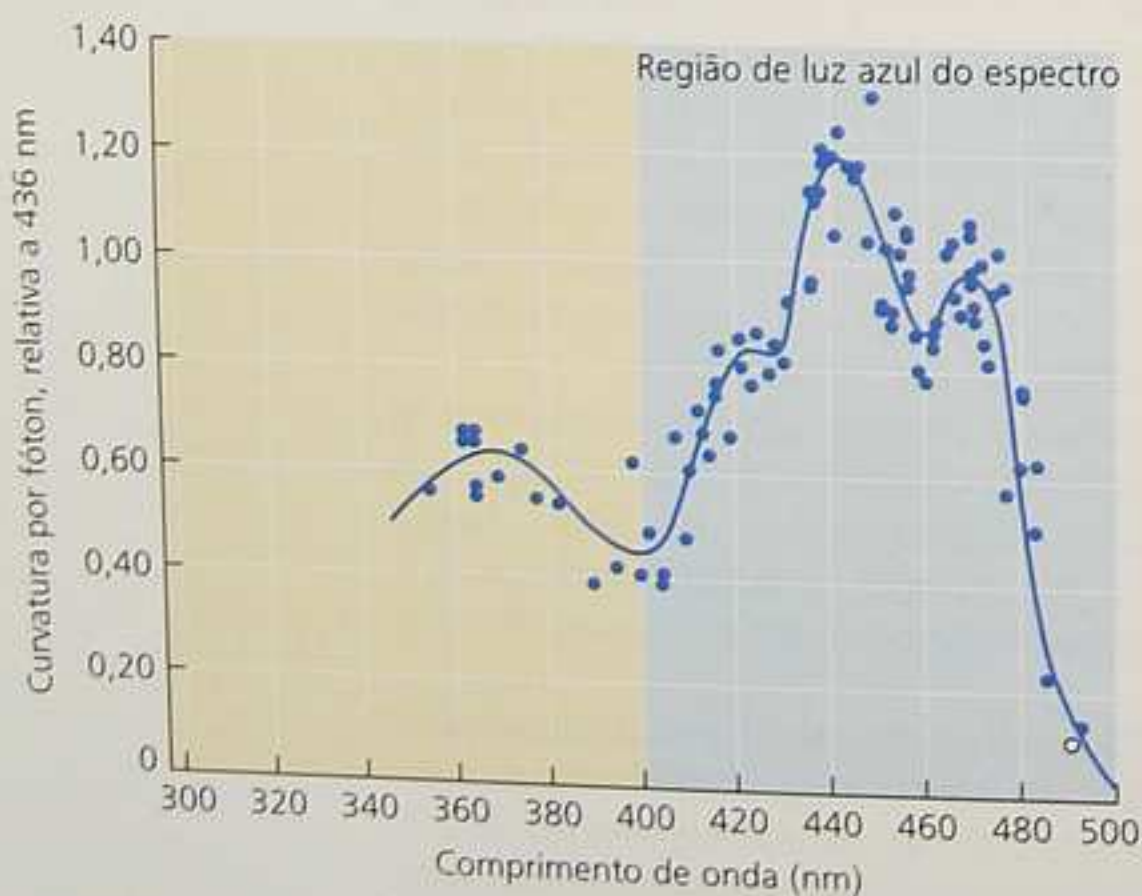
O crescimento em direção à luz (ou, em circunstâncias especiais, em direção oposta) é chamado de **fototropismo**, o qual pode ser observado em fungos, pteridófitas e plantas superiores. O fototropismo é uma resposta **fotomorfogênica**, particularmente marcante em plântulas cultivadas no escuro, tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. A iluminação unilateral é comumente utilizada em estudos experimentais, mas o fototropismo pode também ser observado quando uma plântula é exposta a duas fontes luminosas com luminosidades diferentes (Figura 18.2), uma condição que pode ocorrer na natureza.

Enquanto cresce pelo solo, a parte aérea de uma gramínea é protegida por uma folha modificada que a recobre, denominada **coleóptilo** (Figura 18.3; ver também Figura 19.1). Conforme discussão detalhada no Capítulo 19, a percepção desigual da luz no coleóptilo resulta em concentrações desiguais de auxina nos lados iluminado e sombreado do coleóptilo, crescimento desigual e curvatura.

É importante lembrar que a curvatura fototrópica ocorre apenas em órgãos *em crescimento*, e que tanto coleóptilos quanto partes aéreas com alongamento concluído não se curvarão quando expostos à iluminação unilateral. Em plântulas de gramíneas cultivadas em solo sob luz solar, os coleóptilos cessam o crescimento tão logo a parte aérea tenha emergido e a primeira folha verdadeira, perfurado a ponta do coleóptilo.

Por outro lado, coleóptilos cultivados no escuro, *estiolados*, continuam a se alongar rapidamente por vários dias e, dependendo da espécie, podem atingir vários centímetros de comprimento. A grande resposta fototrópica destes coleóptilos estiolados (ver Figura 18.3) fez deles um modelo clássico para estudos de fototropismo (Firn, 1994).

O espectro de ação mostrado na Figura 18.1 foi obtido por meio da medição dos ângulos de curvatura de coleóptilos de aveia irradiados com luz de diferentes comprimentos de onda. O espectro mostra um pico em aproximadamente 370 nm e o padrão de "três dedos" na região de 400 a 500 nm comentada anteriormente. Um espectro de ação para fototropismo muito similar àquele para coleóptilo de aveia foi encontrado na alfafa (*Medicago sativa*), uma dicotiledônea, sugerindo que um fotorreceptor comum intermedeia o fototropismo nas duas espécies.

O fototropismo em esporangióforos do bolor *Phycomyces* tem sido estudado na tentativa de identificar os genes envolvidos nas respostas fototrópicas. O esporangióforo consiste de um esporângio (um estrutura esférica que carrega os esporos), que se desenvolve sobre uma haste formada por uma única célula muito longa.

Fonte luminosa
Direção do crescimento
Cotilédones
Luz unilateral
Iluminação bilateral desigual
Duas luzes iguais, uma por cada lado
Duas luzes desiguais, uma por cada lado

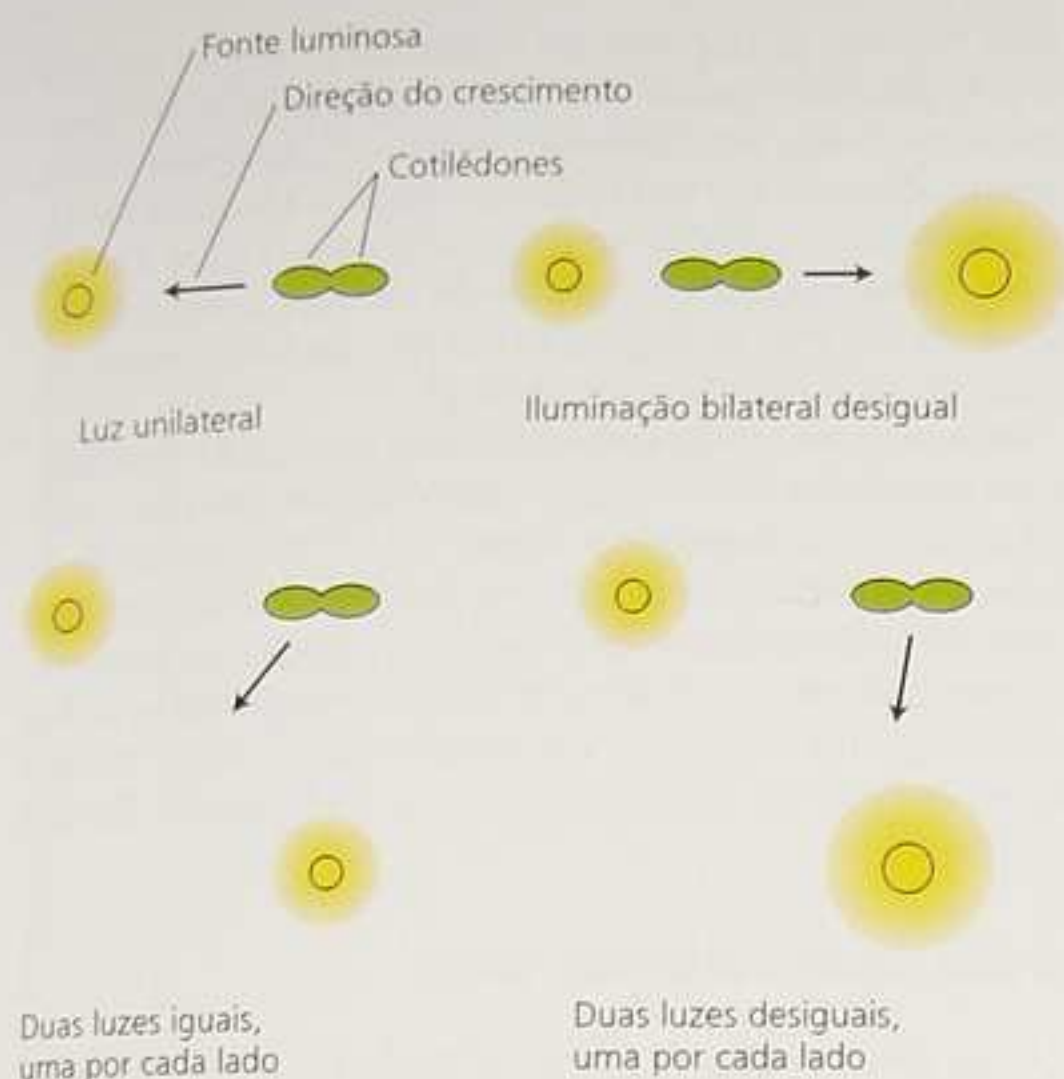



FIGURA 18.2 Relação entre a direção de crescimento e a luz incidente desigual. Os cotilédones de uma plântula jovem são mostrados como vistos de cima. As setas indicam a direção da curvatura fototrópica. Os diagramas ilustram como a direção do crescimento varia com a localização e a intensidade da fonte luminosa, mas o crescimento acontece sempre em direção à luz (Firn, 1994).

O crescimento no esporangióforo está restrito a uma zona de crescimento logo abaixo do esporângio.

Quando irradiado com luz unilateral azul, o esporangióforo curva-se em direção à luz, com um espectro de ação similar àquele do fototropismo dos coleóptilos (Cerda-Olmedo e Lipson, 1987). Estes estudos em *Phycomyces* levaram ao isolamento de vários mutantes com respostas fototrópicas alteradas e com a identificação de vários genes que são necessários para o fototropismo normal.

Mais recentemente, o fototropismo do caule de *Arabidopsis* (Figura 18.4), uma pequena dicotiledônea, tem atraído muita atenção, devido à facilidade com que técnicas moleculares avançadas podem ser aplicadas aos seus mutantes. A genética e a biologia molecular do fototropismo, em *Arabidopsis*, serão discutidos mais adiante neste capítulo.

Como as plantas percebem a direção do sinal luminoso?

Os *gradientes de luz* entre os lados iluminado e sombreado foram medidos em coleóptilos e em hipocótilos de plântulas de dicotiledôneas irradiadas unilateralmente com luz azul. Quando um coleóptilo é iluminado com luz azul de 450 nm, a razão entre a luz que incide sobre a superfície no lado iluminado e a luz que atinge o lado sombreado é 4:1, na extremidade e na seção mediana do coleóptilo, e 8:1, na base (Figura 8.5).

Por outro lado, há um *efeito de lente* no esporangióforo do bolor *Phycomyces* irradiado unilateralmente com luz azul; em conseqüência disto, a luz medida na superfície celular distal do esporangióforo tem aproximadamente o dobro da intensidade da

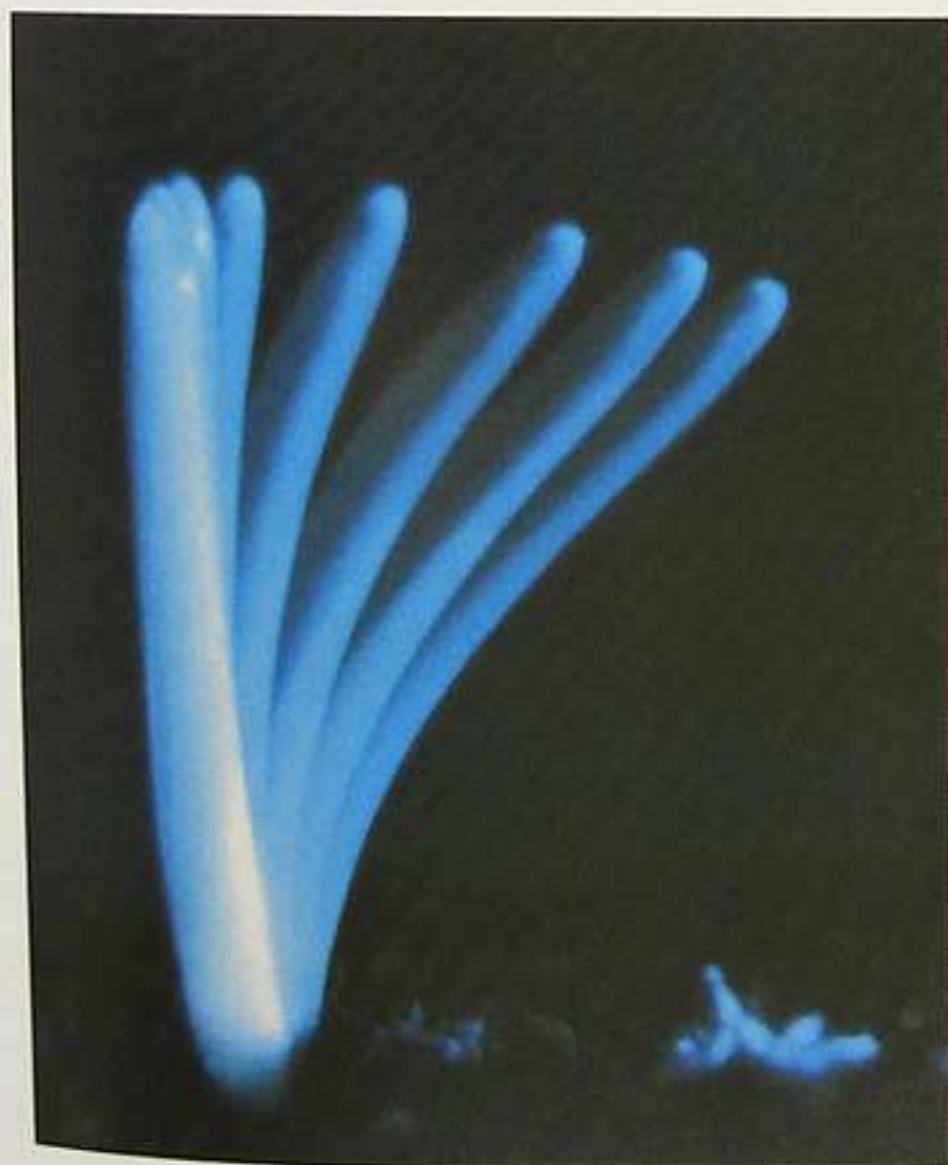



FIGURA 18.3 Fotografia em seqüência temporal de um coleóptilo de milho crescendo em direção a uma fonte unilateral de luz azul aplicada do lado direito. As exposições consecutivas foram feitas com intervalos de 30 minutos. Observar o aumento do ângulo de curvatura com o dobramento do coleóptilo (cedida por M. A. Quiñones).

(A) Tipo selvagem
Luz azul
(B) Mutante
Luz azul

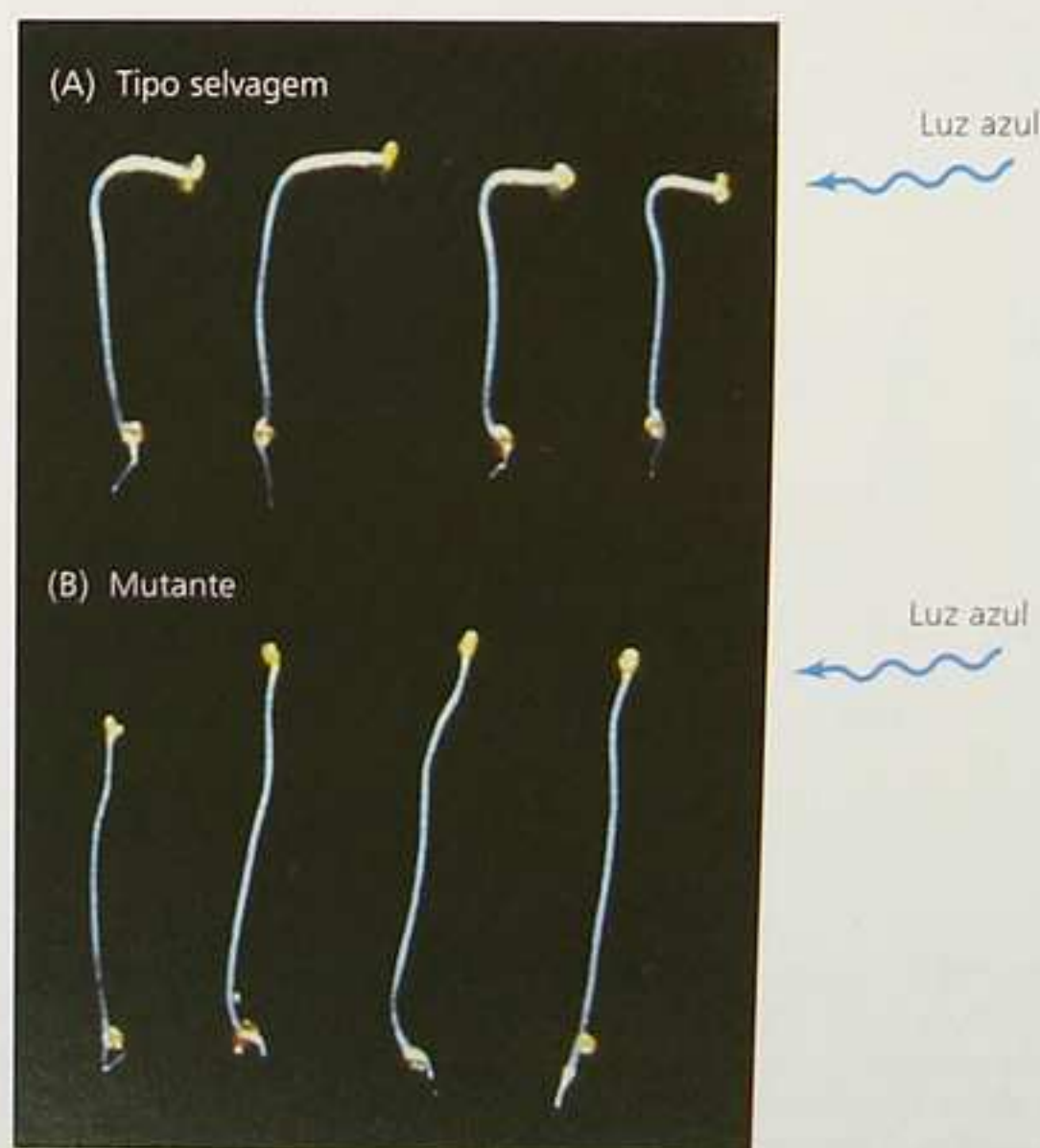



FIGURA 18.4 Fototropismo em plântulas de *Arabidopsis* selvagem (A) e mutante (B). A luz unilateral foi aplicada pelo lado direito (cedida por Dr. Eva Huala).

luz que incide na superfície do lado iluminado. Os gradientes de luz e efeitos lente podem ter um papel importante na forma como um órgão em curvatura percebe a direção da luz unilateral (Vogelmann, 1994).

A luz azul inibe rapidamente o alongamento do caule

Os caules de plântulas cultivadas no escuro alongam-se rapidamente e a inibição desse alongamento pela luz é uma reposta morfogenética-chave da plântula que emerge da superfície do solo (ver Capítulo 17). A conversão do Pr para Pfr (as formas do fitocromo que absorvem a luz vermelha e vermelho-distante, respectivamente) em plântulas estioladas causa uma rápida redução, dependente do fitocromo, na taxa de alongamento (ver Figura 17.1).

Entretanto, os espectros de ação para a redução da taxa de alongamento mostram uma forte atividade na região do azul, que não pode ser explicada pelas propriedades de absorção do fitocromo (ver Figura 17.9). Na realidade, a região do azul, 450 a 500 nm, do espectro de ação para a inibição do alongamento do caule em muito se assemelha com a mesma porção do espectro para o fototropismo (compare os espectros de ação nas Figuras 17.10 e 18.1).

Existem várias métodos experimentais para separar uma redução na taxa de alongamento, mediada pelo fitocromo, da redução mediada por uma resposta à luz azul específica. Se se irradiarem plântulas de alface com baixa fluência de luz azul, sob uma forte luz amarela de fundo, a taxa de alongamento de seu hipocótilo será reduzida em mais de 50%. A luz amarela de fundo estabelece uma razão bem definida Pr:Pfr (ver Capítulo 17). Em tais condições, a baixa fluência de luz azul adicionada é muito pequena para alterar significativamente essa razão, o que elimina a possibilidade de um efeito do fitocromo na redução da taxa de alongamento observado quando da adição da luz azul.

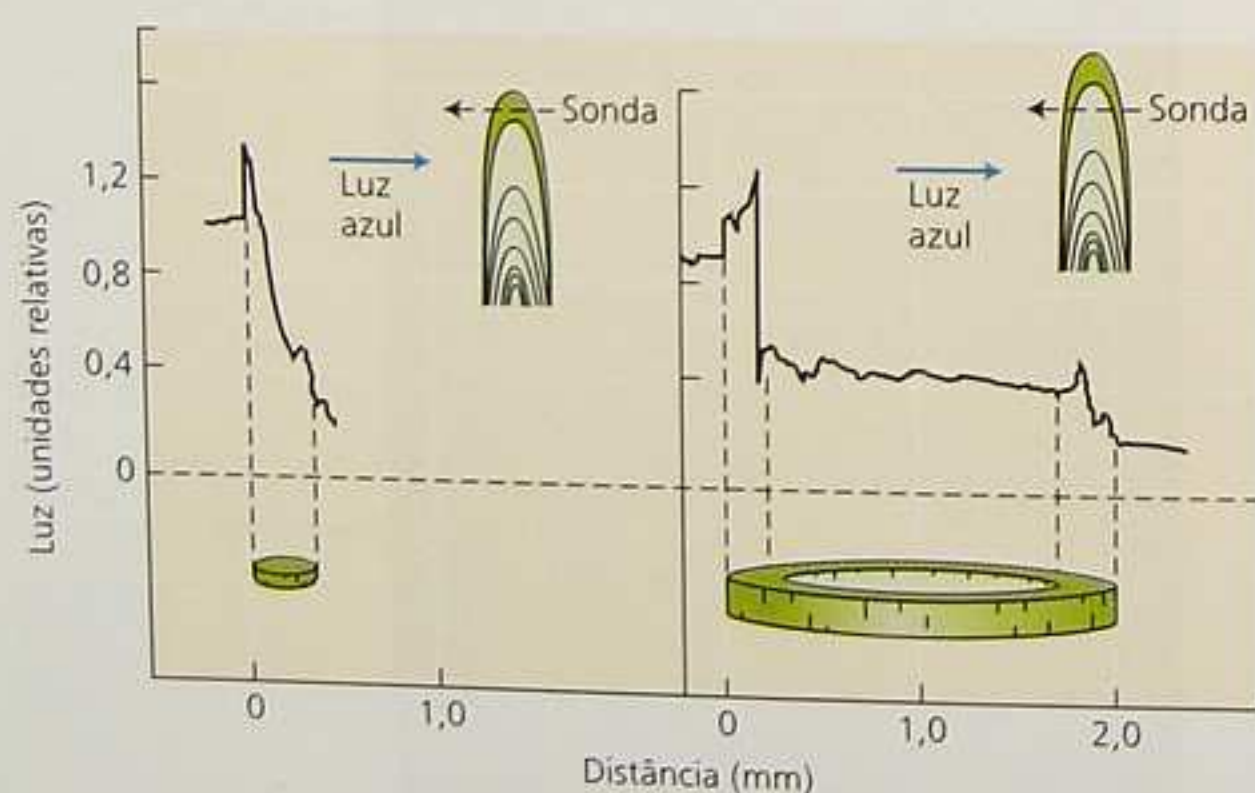



FIGURA 18.5 Distribuição da luz azul, 450 nm, transmitida em um coleóptilo de milho estiolado. O diagrama no canto superior direito de cada um dos quadros mostra a área do coleóptilo sendo medida por uma sonda de fibra óptica. Uma secção transversal do tecido aparece na parte inferior de cada quadro. A linha acima mostra a quantidade de luz percebida pela sonda em cada ponto. Um mecanismo sensorial que dependa do gradiente de luz perceberia a diferença na quantidade de luz entre o lado iluminado e o sombreado do coleóptilo, informação esta que seria transduzida em uma concentração desigual de auxina e curvatura (Vogelmann e Haupt, 1985).

Pela rapidez, as respostas do hipocótilo mediadas pela luz azul e pelo fitocromo podem também ser distinguidas. Enquanto mudanças mediadas pelo fitocromo podem ser detectadas em 8 a 90 minutos, dependendo da espécie, as repostas à luz azul são rápidas, podendo ser medidas em 15 a 30 segundos (Figura 18.6). As interações entre fitocromo e a cascata de transdução sensorial dependente da luz azul, na regulação das taxa de alongamento, serão descritas mais adiante neste capítulo.

Outra resposta rápida estimulada pela luz azul é a despolarização da membrana das células do hipocótilo, que precede a inibição da taxa de crescimento (ver Figura 18.6). A despolarização da membrana é causada pela ativação de canais de ânions (ver Capítulo 6), o que facilita o efluxo de ânions tais como cloreto, por exemplo. A utilização de um bloqueador do canal de ânions impede a despolarização da membrana dependente da luz azul e reduz o efeito inibitório dessa luz no alongamento do hipocótilo (Parks e cols., 1998).

A luz azul regula a expressão gênica

A luz azul também regula a expressão de genes envolvidos em vários processos morfogenéticos importantes. Alguns desses genes ativados pela luz já foram estudados com detalhe – por exemplo, os genes que codificam a enzima chalcona sintase, que catalisa o primeiro passo dado na biossíntese de flavonóides, a pequena subunidade da rubisco, e as proteínas que ligam as clorofilas *a* e *b* (ver Capítulos 13, 8 e 7, respectivamente). A maioria dos estudos com genes ativados pela luz mostra sensibilidade, tanto para a luz azul quanto para vermelha, além de reversibilidade vermelho/vermelho-distante, implicando respostas dos fitocromos e específicas para luz azul.

Um estudo recente relatou que o SIG5, um dos seis genes nucleares SIG em *Arabidopsis* com um papel regulador na transcrição do gene psbD do cloroplasto, que codifica a subunidade D2 do centro de reação PSII (ver Capítulo 7), é especificamente ativado pela luz azul (Tsunoyama e cols., 2002). Em contraste, os outros cinco genes SIG são ativados tanto por luz azul quanto por vermelha.

Outro caso bem documentado de expressão gênica, mediada somente por um sistema de percepção da luz azul, envolve o gene GSA na alga unicelular fotossintetizante *Chlamydomonas reinhardtii* (Matters e Beale, 1995), o qual codifica a glutamato-1-semialdeído aminotransferase (GSA), uma enzima-chave na rota de biossíntese da clorofila (ver Capítulo 7). A ausência de fitocromo C em *C. reinhardtii* simplifica a análise das respostas à luz azul neste sistema experimental.

Em culturas sincronizadas de *C. reinhardtii*, os níveis de mRNA de GSA são estritamente regulados pela luz azul e, após duas horas do início da iluminação, os níveis de mRNA de GSA são 26 vezes maiores do que eram no escuro (Figura 18.7). Esses aumentos de mRNA mediados pela luz azul precedem aumentos no conteúdo de clorofila, indicando que a biossíntese da clorofila está sendo regulada pela ativação do gene GSA.

A luz azul estimula a abertura estomática

Agora, a atenção será focada nas repostas estomáticas à luz azul. Os estômatos desempenham um importante pa-

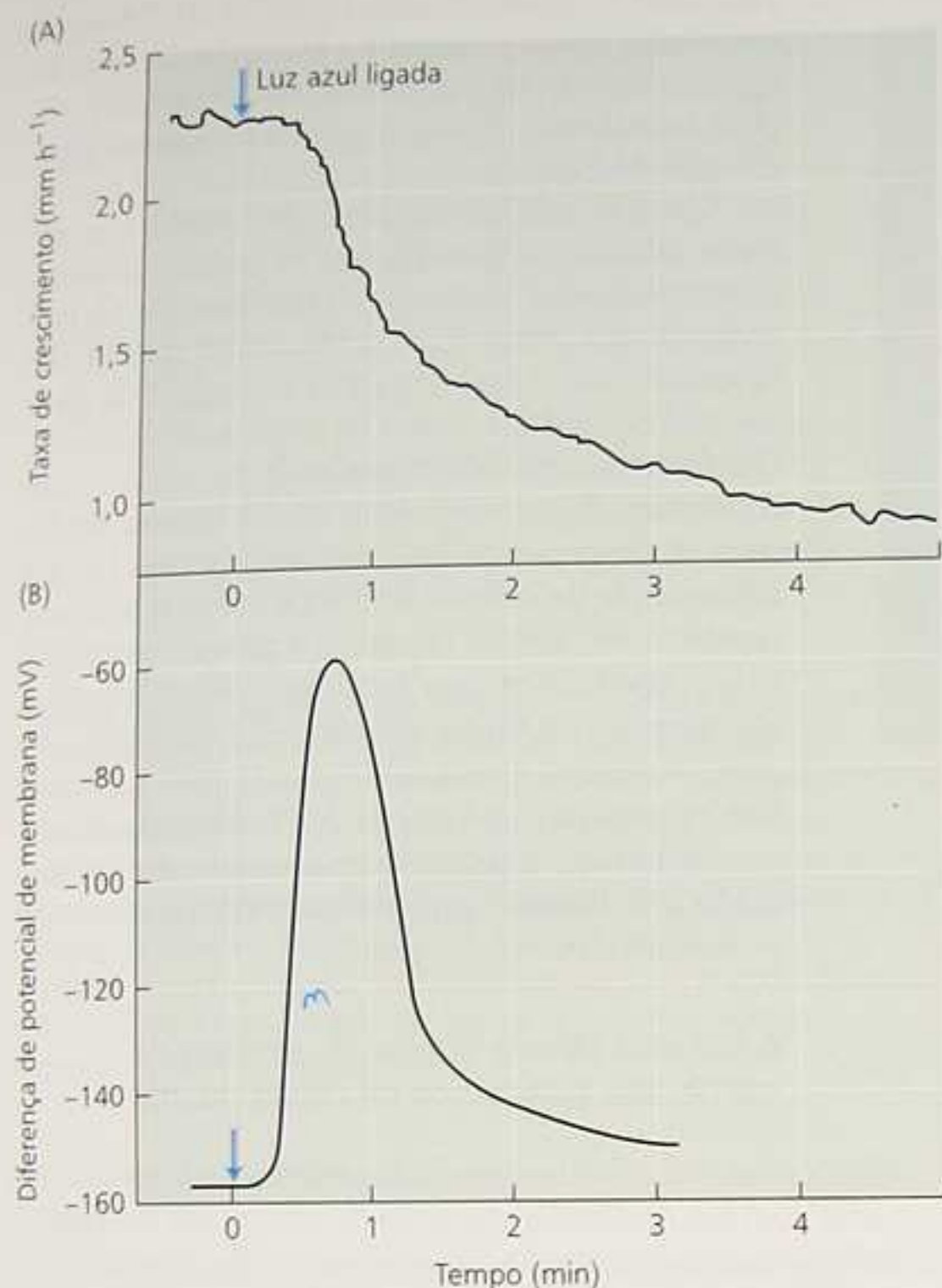



FIGURA 18.6 Alterações na taxa de alongamento de plântulas estioladas de pepino (A) e despolarização transiente da membrana das células do hipocótilo (B) induzidas pela luz azul. Na medida em que a despolarização da membrana (medida com eletrodos intracelulares) atinge seu máximo, a taxa de crescimento (medida com transdutores de posição) cai rapidamente. A comparação das duas curvas mostra que a membrana começa a despolarizar antes do início do declínio da taxa de crescimento, sugerindo uma relação de causa-efeito entre os dois fenômenos (Spalding e Cosgrove, 1989).

pel regulador nas trocas gasosas nas folhas (ver Capítulo 9) e podem, freqüentemente, afetar a produtividade das culturas agrícolas (ver Capítulo 25). Várias características dos movimentos estomáticos dependentes da luz azul fazem das células-guarda um valioso sistema experimental para o estudo das respostas à luz azul:

- A resposta estomática à luz azul é rápida e reversível, estando localizada em um único tipo de célula, a célula-guarda.
- A resposta estomática à luz azul regula os movimentos estomáticos ao longo de toda a vida da planta. Esta resposta é diferente do fototropismo ou no alongamento dos hipocótilos, os quais são funcionalmente importantes nos estádios iniciais de desenvolvimento.
- A cascata de transdução de sinal que liga a percepção da luz azul à abertura dos estômatos é conhecida em considerável detalhe.

Nas seções a seguir, serão discutidos dois aspectos centrais da resposta estomática à luz: os mecanismos osmorreguladores responsáveis pelos movimentos estomáticos e o papel da H^+-ATPase ativada pela luz azul na absorção de íons pelas células-guarda.

A luz é o sinal ambiental dominante que controla os movimentos estomáticos nas folhas de plantas bem hidratadas, que crescem em ambientes naturais. Os estômatos abrem no momento em que os níveis de luz que chegam à superfície da folha aumentam e fecham quando eles decrescem (Figura 18.8). Em folhas de *Vicia faba* cultivadas em casas de vegetação, os movimentos estomáticos seguem com precisão a radiação solar incidente na superfície da folha (Figura 18.9).

Os primeiros estudos das respostas estomáticas à luz mostraram que o DCMU (diclorofenil-dimetiluréia), um inibidor do transporte fotossintético de elétrons (ver Figura 7.31), provoca uma inibição parcial na abertura estomática estimulada pela luz. Tais resultados indicam que a fotossíntese nos cloroplastos das células-guarda tem um papel na abertura estomática dependente da luz, mas a observação de que a inibição era apenas parcial apontou para um componente não-fotossintético da resposta estomática à luz. Estudos detalhados da resposta dos estômatos à luz mostraram que esta ativa duas respostas das células-guarda: fotossíntese nos cloroplastos das células-guarda (ver **Ensaio 18.1 na Internet**) e uma resposta específica à luz azul.

A resposta específica dos estômatos à luz azul não pode ser vista apropriadamente sob iluminação com este tipo de luz. Isto acontece porque a luz azul estimula simultaneamente a resposta específica a ela e à fotossíntese das células-guarda (para a resposta fotossintética à luz azul, ver o espectro de ação para fotossíntese na Figura 7.8). Uma separação bem definida das respostas desses dois comportamentos em relação à luz pode ser obtida em experimentos com uma fonte luminosa de feixe duplo. Altas taxas de fluência de luz vermelha são utilizados para saturar a resposta fotossintética e baixos fluxos de fótons de luz azul são adicionados após a reposta à luz vermelha saturante ser completada (Figura

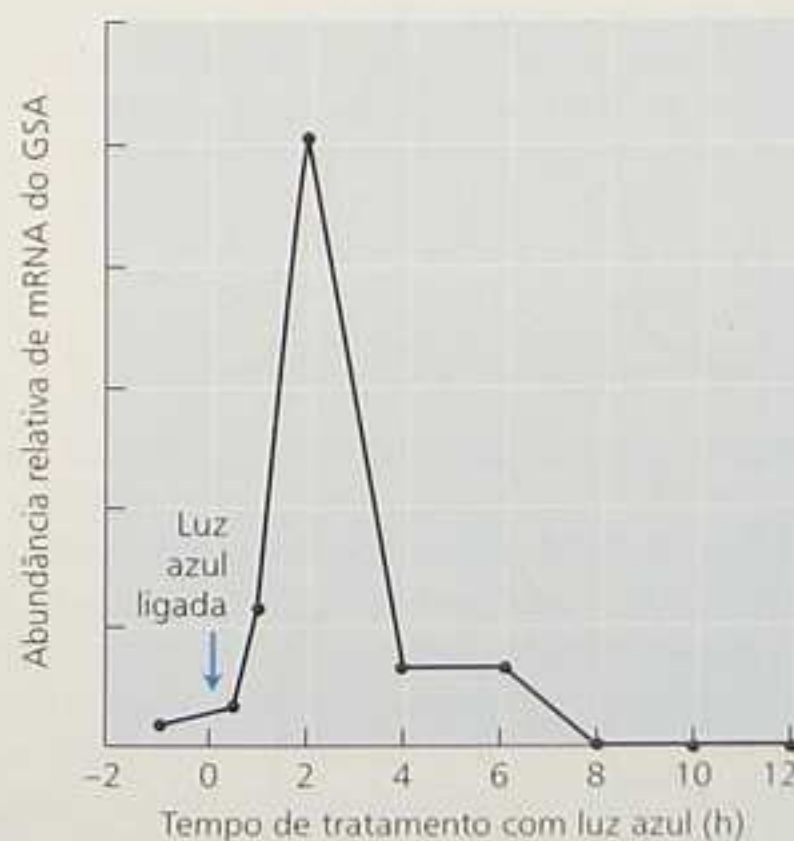



FIGURA 18.7 Progressão temporal da expressão gênica dependente da luz azul em *Chlamidomonas reinhardtii*. O gene GSA codifica a enzima glutamato-1-semialdeído aminotransferase, a qual regula um passo inicial na biossíntese da clorofila (Matters e Beale, 1995).

(A) (B)

Cloroplasto
Poro
Células-guarda
20 μm

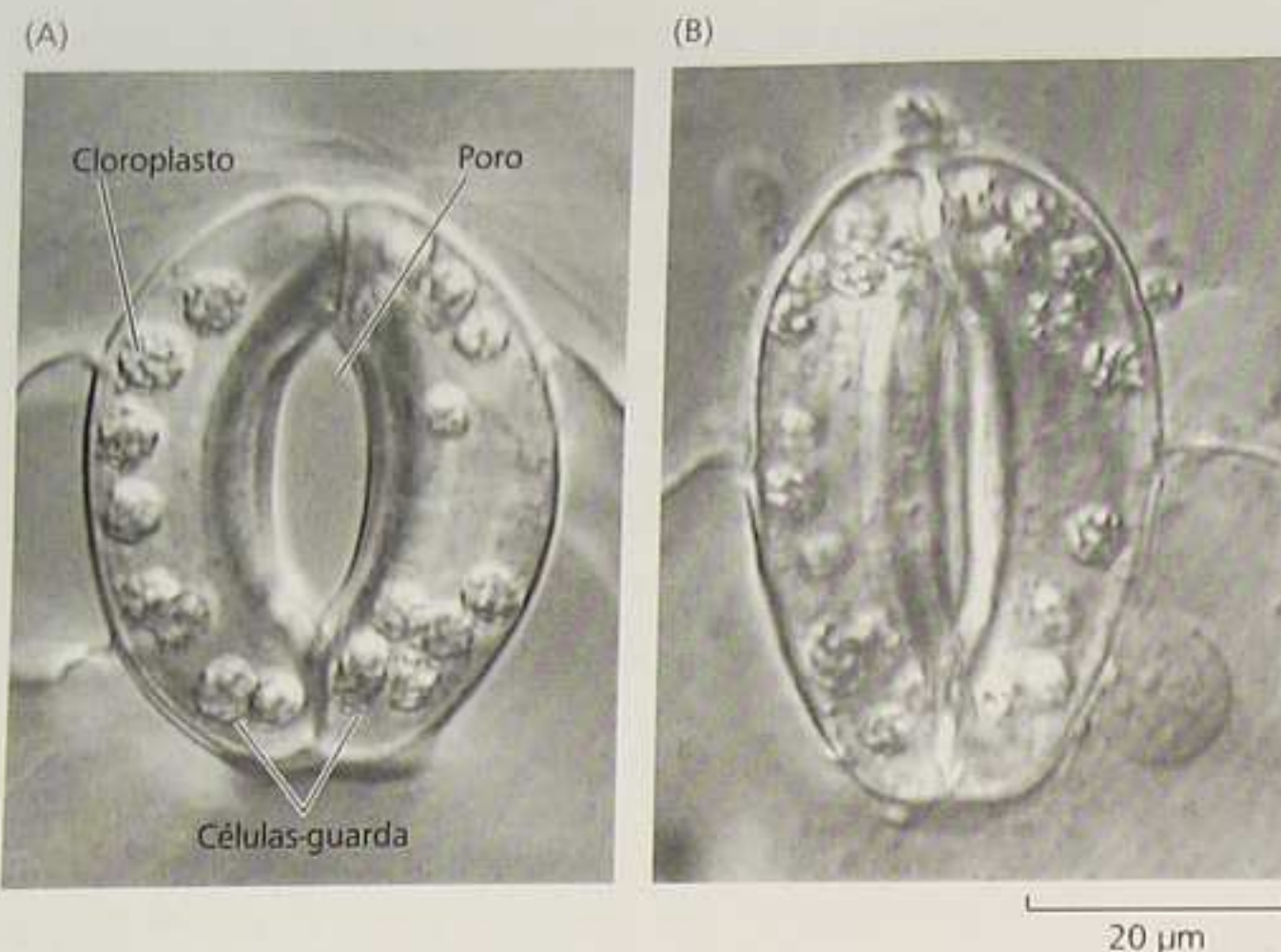



FIGURA 18.8 Abertura estomática estimulada pela luz em epiderme isolada de *Vicia faba*. O estômato aberto após tratamento com luz (A) é mostrado no estado fechado, após tratamento no escuro (B). A abertura estomática é quantificada por meio da medição microscópica da abertura do poro estomático (cedida por E. Raveh).

18.10). A adição da luz azul leva a um aumento substancial na abertura estomática, que não pode ser explicado por um crescimento na estimulação da fotossíntese das células-guarda, pois a fotossíntese está saturada pela luz vermelha de fundo.

Um espectro de ação para a resposta estomática à luz azul sob uma iluminação vermelha de fundo mostra o padrão dos três dedos discutido anteriormente (Figura 18.11). Tal espectro de ação, típico da resposta à luz azul e diferente do espectro de ação da fotossíntese, indica que, em adição à fotossíntese, as células-guarda respondem especificamente à luz azul.

Quando as células-guarda são tratadas com enzimas celulolíticas que digerem as paredes celulares, os *protoplastos das células-guarda* são liberados. Os protoplastos das células-guarda *intumescem* quando iluminados com luz azul (Figura 18.12), indicando que a luz azul é percebida dentro da própria célula guarda. O intumescimento dos protoplastos das células-guarda também ilustra como estas células intactas funcionam. A absorção de íons estimulada pela luz e a acumulação de solutos orgânicos reduz o potencial osmótico das células (aumenta a pressão osmótica). Como resultado, a água entra nas células, levando a um aumento em turgor que, nas células-guardas com paredes intactas, é traduzido em um aumento na abertura estomática (ver Capítulo 4). Na ausência de uma parede celular, o aumento de pressão osmótica mediado pela luz azul provoca um intumescimento do protoplasto das células-guarda.

A luz azul ativa a bomba de prótons na membrana plasmática da célula-guarda

Quando os protoplastos das células-guarda de *Vicia faba* são irradiados com luz azul sob iluminação de fundo com luz vermelha, o pH do meio de suspensão torna-se mais ácido (Figura 18.13). Essa acidificação induzida pela luz azul é bloqueada por inibidores que dissipam gradientes de pH, tal como CCCP (discutido a seguir), e por inibidores da bomba de prótons H^+-ATPase, tal como vanadato (ver Figura 18.12B; ver também Capítulo 6).

Isto indica que *a acidificação resulta da ativação pela luz azul de uma ATPase bombeadora de prótons na membrana plasmática da célula-guarda*, que envia prótons para o meio de suspensão do protoplasto e reduz seu pH. Na folha intacta, tal estimulação pela luz azul do bombeamento de prótons reduz o pH do espaço apoplástico ao redor das células-guarda. A ATPase da membrana plasmática das células-guarda já foi isolada e extensivamente caracterizada (Kinoshita e cols., 2001).

A ativação de bombas eletrogênicas, tipo a ATPase bombeadora de prótons, pode ser medida em experimentos de *patch-clamping* como uma corrente elétrica para fora da membrana plasmática (ver **Tópico 6.2 na Internet** para uma descrição de *patch-clamping*). Um registro de *patch clamp* de um protoplasto de célula-guarda tratado com a toxina fúngica fusicocina, um ativador bem caracterizado da ATPase da membrana plasmática, é mostrado na Figura

(A)
Radiação fotossinteticamente ativa (400–700 nm) (μmol m⁻² s⁻¹)
1.250
1.000
750
500
250
0
(B)
Abertura estomática (largura do poro, μm)
14
12
10
8
6
4
2
0
5:00 9:00 13:00 17:00 21:00
Hora do dia

FIGURA 18.9 A abertura estomática segue a radiação fotossinteticamente ativa na superfície da folha. A abertura estomática na superfície abaxial das folhas de *Vicia faba* cultivadas em casa de vegetação, medida pela abertura do poro estomático (A), segue de perto os níveis da radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm) incidente sobre a folha (B), indicando que a resposta à luz foi a dominante na regulação da abertura estomática (Srivastava e Zeiger, 1995a).

FIGURA 18.10 A resposta do estômato à luz azul sob uma luz vermelha de fundo. Os estômatos de uma epiderme isolada de *Commelina communis* foram tratados com fluxo de fótons saturantes de luz vermelha (linha vermelha). Em um tratamento paralelo, os estômatos iluminados com luz vermelha foram também iluminados com luz azul, conforme indicado pela seta (linha azul). O aumento na abertura estomática, acima do nível alcançado na presença da luz vermelha saturante, indica que um sistema de fotorreceptor diferente, etimulado pela luz azul, está mediando os aumentos adicionais na abertura (Schwartz e Zeiger, 1984).

FIGURA 18.12 Intumescimento de protoplastos das células-guarda estimulado pela luz azul. (A) Na ausência de uma parede celular rígida, os protoplastos de células-guarda de cebola (*Allium cepa*) intumescem. (B) A luz azul estimula o intumescimento dos protoplastos de células-guarda de *Vicia faba* e o vanadato, um inibidor da H^+-ATPase, inibe o intumescimento. A luz azul estimula a absorção de íons e de água nos protoplastos das células-guarda, o que, quando estas células estão intactas fornece a força mecânica para o aumento da abertura estomática (A de Zeiger e Hepler, 1977; B segundo Amodeo e cols., 1992).

18.14A. Exposição à fusicocina estimula um corrente elétrica para fora, a qual é interrompida pelo ionóforo de prótons carbonil cianido *m*-clorofenil-hidrazona (CCCP). Esse ionóforo de prótons torna a membrana plasmática altamente permeável a prótons, evitando a formação de um gradiente de prótons através da membrana e acaba com o efluxo líquido de prótons.

A relação entre o bombeamento de prótons na membrana plasmática das célula-guarda e abertura estomática é evidente a partir da observação de que a fusicocina estimula tanto a extrusão de prótons da célula-guarda quanto a abertura estomática, e que o CCCP inibe a abertura estimulada pela fusicocina. O aumento nas taxas de bombeamento de prótons em função das taxas de fluência de luz azul (ver Figura 18.13) indica que taxas crescentes de fótons azuis na radiação solar que atinge a folha causam uma maior abertura estomática.

A relação próxima entre o número de fótons incidentes de luz azul, o bombeamento de prótons na membrana plasmática da célula-guarda e a abertura estomática sugerem que a resposta dos estômatos à luz azul pode funcionar como um sensor do fluxo de fótons que atingem as células-guarda.

Os pulsos de luz azul aplicados sob uma luz vermelha saturante de fundo também estimulam uma corrente elétrica para fora dos protoplastos das células-guarda (ver Figura 18.14B). As medições da acidificação mostradas na Figura 18.13 indicam que a corrente elétrica para fora medida nos experimentos de *patch clamp* é gerada por prótons.

FIGURA 18.11 Espectro de ação para a abertura estomática estimulada pela luz azul (sob luz de fundo vermelha) (Karlsson, 1986).

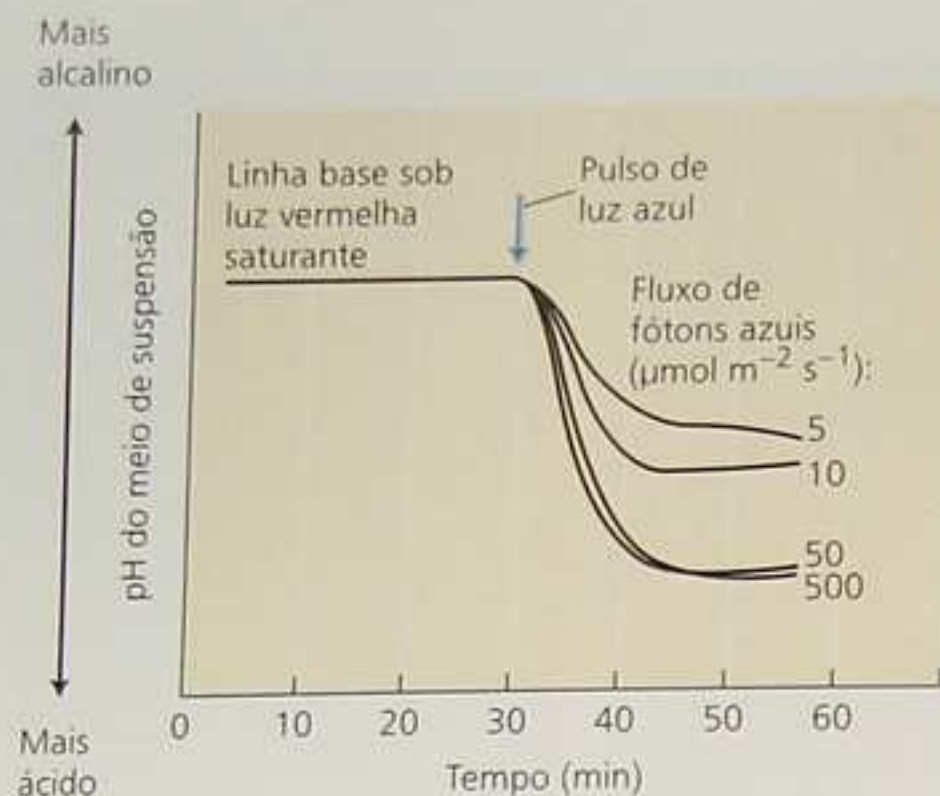



FIGURA 18.13 Acidificação de um meio de suspensão de protoplastos de células-guarda de *Vicia faba* estimulado por um pulso de 30 s de luz azul. A ativação resulta da estimulação de uma H^+-ATPase na membrana plasmática pela luz azul e está associada com o intumesciento dos protoplastos (ver Figura 18.12) (Shimazaki e cols., 1986).

FIGURA 18.14 A ativação da H^+-ATPase na membrana plasmática de protoplastos das células-guarda por fusicocina e luz azul pode ser mensurada como uma corrente elétrica em experimentos de *patch clamp*. (A) Corrente elétrica para fora (medida em picoamperes, pA) na membrana plasmática de um protoplasto de célula-guarda estimulado pela toxina fúngica fusicocina, um ativador da H^+-ATPase. A corrente é terminada pelo ionóforo de prótons CCCP (carbonil cianido *m*-clorofenil-hidrazona). (B) Corrente elétrica para fora na membrana plasmática de um protoplasto de célula-guarda estimulado por um pulso de luz azul. Tais resultados indicam que a luz azul estimula a H^+-ATPase (A segundo Serrano e cols., 1988; B segundo Assmann e cols., 1985).

As respostas à luz azul possuem cinética e *lag times* característicos

Algumas das características das respostas a pulsos de luz azul destacam algumas propriedades importantes das respostas à luz azul: a persistência da resposta após o sinal luminoso ter sido desligado e um *lag time* significante separando o início do sinal luminoso e o começo da resposta.

Em contraste com respostas fotossintéticas típicas, que são ativadas rapidamente após o sinal de "luz ligada" e cessam quando a luz é desligada (ver, por exemplo, a Figura 7.13), as respostas à luz azul continuam na taxa máxima por vários minutos após a aplicação do pulso (ver Figura 18.14B). Esta propriedade pode ser explicada por uma forma fisiologicamente inativa dos receptores de luz azul que é convertida em uma forma ativa pela luz azul, com a forma ativa revertendo de modo lento aquela fisiologicamente inativa na ausência da luz azul (Iino e cols., 1985). A taxa da resposta a um pulso de luz azul dependeria, assim, do tempo decorrido da conversão da forma ativa para a inativa.

Outra propriedade da resposta a pulsos de luz azul é o *lag time*, cuja duração é de aproximadamente 25 s, tanto na resposta de acidificação quanto na corrente elétrica para fora estimulada pela luz azul (ver figuras 18.13 e 18.14). Esse tempo é provavelmente necessário para a cascata de transdução de sinal proceder do sítio fotorreceptor para a ATPase bombeadora de prótons e para a formação do gradiente de prótons. *Lag times* similares foram medidos para a inibição dependente da luz azul do alongamento do hipocótilo, que já foi discutido.

A luz azul regula as relações osmóticas das células-guarda

A luz azul modula a osmorregulação das células-guarda pela sua ativação do bombeamento de prótons (descrito anteriormente) e por meio da estimulação da síntese de solutos orgânicos. Antes de discutir tais respostas à luz azul, serão brevemente descritos os principais solutos osmoticamente ativos nas células-guarda.

De acordo com o botânico Hugo von Mohl (1856), as alterações de turgor nas células-guarda fornecem a força mecânica para as mudanças na abertura estomática. O fisiologista vegetal F.E. Loyd lançou, em 1908, a hipótese segundo a qual o turgor das células-guarda é regulado por alterações osmóticas resultantes de interconversões amido-açúcar, um conceito que levou a uma hipótese de amido-açúcar do movimento estomático. A descoberta, na década de 1960, das alterações da concentração de potássio nas células-guarda conduziu à moderna teoria da osmorregulação dessas células pelo potássio e seus íons de contrabalanço.

A concentração de potássio nas células-guarda aumenta várias vezes quando os estômatos abrem: de 100 mM, quando fechados, para 400 a 800 mM, quando abertos, dependendo da espécie vegetal e das condições experimentais. Essas grandes alterações de concentração do íon potássio positivamente carregado são equilibradas eletricamente pelos ânions Cl^- e malato^{2-} (Figura 18.15A). Em espécies do gênero *Allium*, tais como cebola (*Allium cepa*), íons K^+ são equilibrados apenas por Cl^-. Na maioria das espécies, entretanto, os fluxos de potássio são equilibra-

dos por quantidades variáveis de Cl^- e do ânion orgânico malato^{2-} (Talbott e cols., 1996).

O íon Cl^- é trazido para dentro das células-guarda durante a abertura dos estômatos e expelido no fechamento. O malato, por outro lado, é sintetizado no citosol da célula-guarda, em uma rota metabólica que utiliza esqueletos de carbono gerados pela hidrólise do amido (ver Figura 18.15B). O conteúdo de malato das células-guarda decresce durante o fechamento estomático, porém ainda precisa ser esclarecido se o malato é catabolizado na respiração mitocondrial ou é expelido para o apoplasto.

O potássio e o cloreto são trazidos para dentro das células-guarda via mecanismos de transporte secundário acionados pelo gradiente de potencial eletroquímico de H^+, $\Delta\mu_{H^+}$, operado pela bomba de prótons (ver Capítulo 6) já discutida neste capítulo. A extrusão de prótons torna mais negativa a diferença de potencial elétrico através da membrana plasmática da célula-guarda; hiperpolarizações, dependentes da luz, de até 50 mV já foram registradas. Além disto, o bombeamento de prótons gera um gradiente de pH de aproximadamente 0,5 a 1 unidade de pH.

O componente elétrico do gradiente de prótons fornece a força operacional para a absorção passiva de íons potássio pelos canais de potássio regulados pela voltagem (ver Capítulo 6) (Schroeder e cols., 2001). Acredita-se que o cloreto seja absorvido pelos canais de ânions. Assim, a estimulação do bombeamento de prótons dependente da luz azul tem um papel fundamental na osmorregulação durante os movimentos estomáticos dependentes da luz.

Os cloroplastos das células-guarda (ver Figura 18.8) contêm grandes grãos de amido, com seu conteúdo de amido decrescendo durante a abertura estomática e aumentando durante o fechamento. O amido, um polímero de glicose de alto peso molecular e insolúvel, não contribui para o potencial osmótico das células; no entanto, a hidrólise do amido em açúcares solúveis causa um decréscimo no potencial osmótico (ou um aumento na pressão osmótica) das células-guarda. No processo inverso, a síntese do amido reduz a concentração de açúcar, resultando em um aumento do potencial osmótico da célula, que, conforme prediz a hipótese amido-açúcar, está associado com o fechamento estomático.

Com a descoberta do importante papel do potássio e seus contra-íons na osmorregulação das células-guarda, a hipótese do açúcar-amido não foi mais considerada importante (Outlaw, 1983). Entretanto, estudos recentes, descritos na próxima seção, têm caracterizado uma importante fase osmorregulatória das células-guarda, onde a sacarose é o soluto osmoticamente ativo dominante.

A sacarose é um soluto osmoticamente ativo nas células-guarda

Estudos do curso diário dos movimentos estomáticos em folhas intactas mostram que o conteúdo de potássio nas células-guarda aumenta em paralelo com a abertura estomática no início da manhã, mas decresce no início da tarde sob condições nas quais a abertura continua a aumentar. O conteúdo de sacarose das células-guarda aumenta lentamente pela manhã, porém, com o efluxo de potássio, a sacarose torna-se o soluto osmoticamente ativo dominante e o fechamento estomático no final do dia é acompanhado por um decréscimo no conteúdo de sacarose nas células-guarda (Figura 18.16) (Talbott e Zeiger, 1998).

Essas características osmorreguladoras indicam que a abertura dos estômatos está associada primariamente à absorção de K^+ e o fechamento, a um decréscimo no conteúdo de sacarose (ver Figura 18.16). A necessidade de fases distintas de osmorregulação dominadas por potássio e sacarose não está esclarecida, porém ela pode estar associada a aspectos reguladores da função estomática. O potássio pode ser o soluto preferido para a consistente abertura diária, que ocorre com o nascer do sol. A fase da sacarose pode estar associada com a coordenação dos movimentos estomáticos na epiderme às taxas de fotossíntese no mesofilo.

De onde são originados os solutos osmoticamente ativos? Foram identificadas quatro rotas metabólicas distintas, as quais podem suprir as células-guarda com solutos osmoticamente ativos (ver Figura 18.15):

1. A absorção de K^+ e Cl^- acoplados à biossíntese de malato^{2-}.
2. A produção de sacarose a partir da hidrólise do amido.
3. A produção de sacarose pela fixação fotossintética do carbono nos cloroplastos das células-guarda.
4. A absorção da sacarose apoplástica gerada pela fotossíntese do mesofilo.

Dependendo das condições ambientais, uma ou várias rotas podem ser ativadas. Por exemplo, a abertura estomática, estimulada pela luz vermelha em epidermes isoladas, depende exclusivamente da sacarose gerada pela fotossíntese das células-guarda, sem absorção detectável de K^+. As outras rotas osmorreguladoras podem ser seletivamente ativadas sob diferentes condições experimentais (ver **Tópico 18.1 na Internet**). Estudos recentes estão começando a desvendar os mistérios da osmorregulação das células-guarda em folhas intactas (Dietrich e cols., 2001).

FOTORRECEPTORES DE LUZ AZUL

Experimentos conduzidos por Charles Darwin e seu filho Francis no século XIX determinaram que o sítio da fotorrecepção no fototropismo estimulado pela luz azul está no ápice do coleóptilo. As primeiras hipóteses sobre os fotorreceptores de luz azul centraram-se nos carotenóides e nas flavinas (para uma abordagem histórica das pesquisas iniciais sobre os fotorreceptores de luz azul, ver o **Tópico 18.2 na Internet**). Mesmo com os grandes esforços de pesquisa, até o início da década de 1990 não houve avanços significativos no sentido da identificação do fotorreceptores de luz azul. No caso do fototropismo e da inibição do alongamento do caule, o progresso resultou da identificação de mutantes para respostas-chave à luz azul e o subseqüente isolamento do gene relevante.

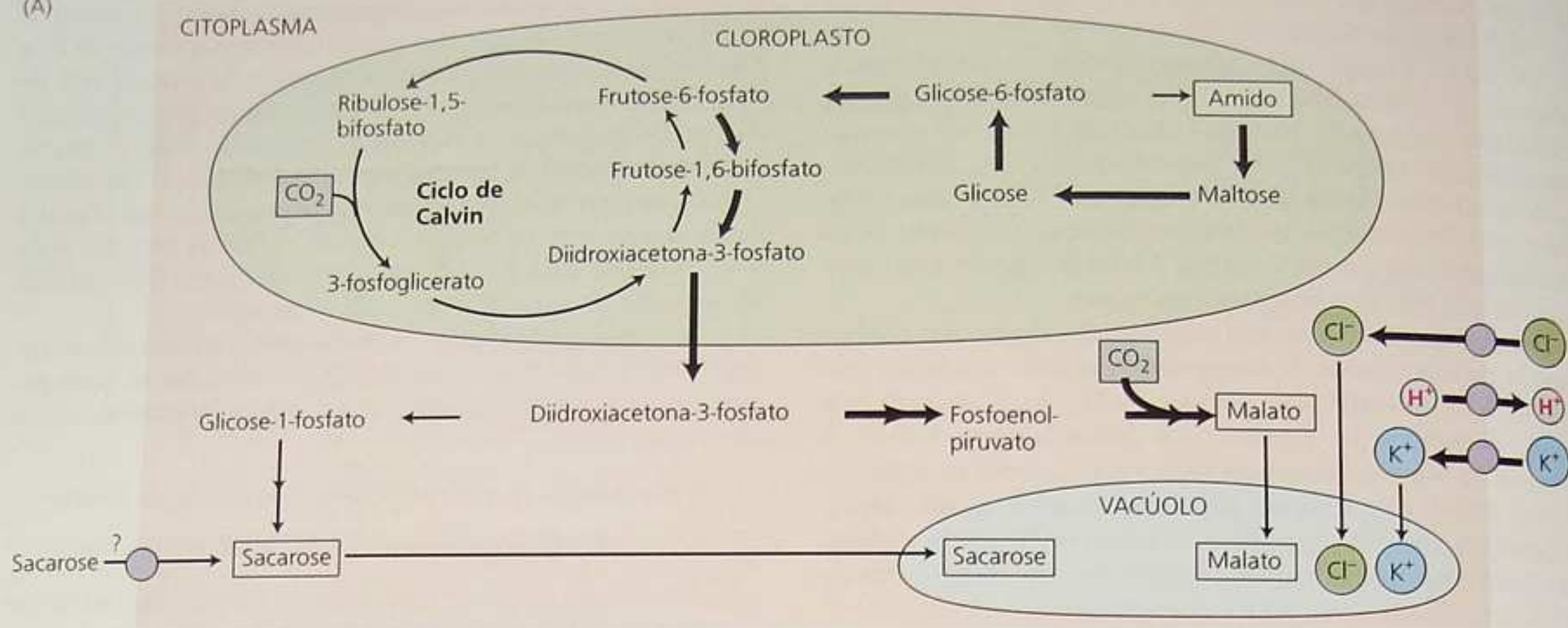
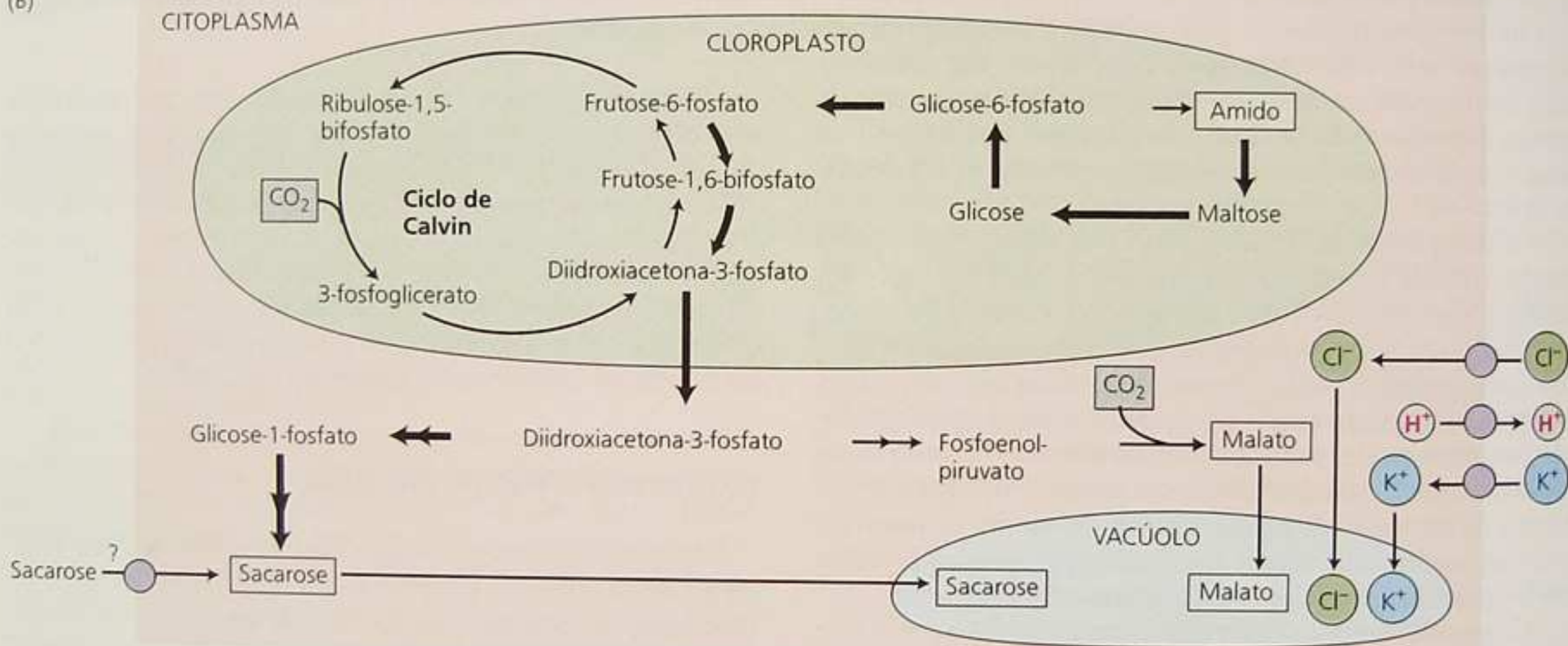
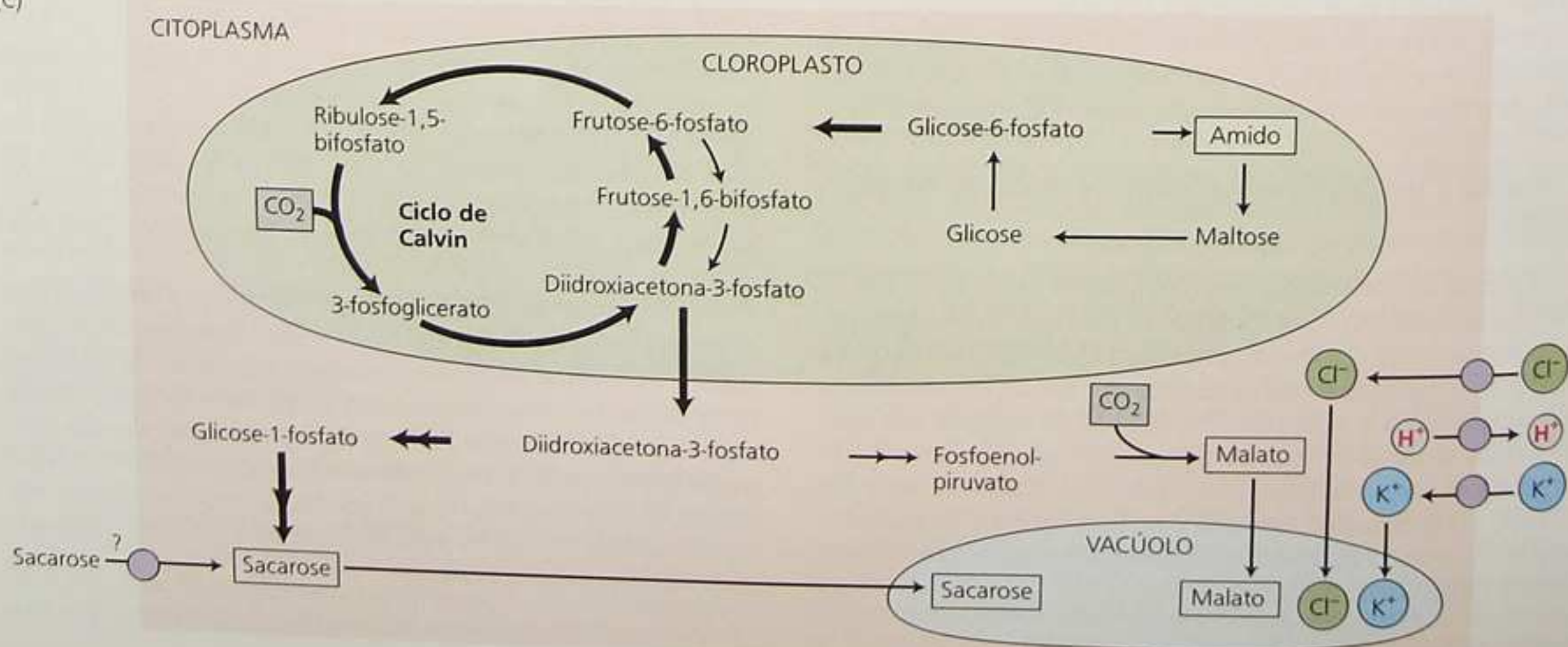
A clonagem do gene levou à identificação e à caracterização da proteína codificada por ele. No caso das células-guarda, o carotenóide zeaxantina foi postulado como o cromóforo de um fotorreceptor de luz azul, enquanto a identidade da apoproteína permanece desconhecida. Para uma discussão detalhada das diferenças básicas entre fotorreceptores carotenóides e flavinas ver o **Tópico 18.3 na Internet**. Na próxima seção, serão descritos os três fotorreceptores associados com as respostas à luz azul: criptocromos, fototropinas e zeaxantina.

◀ **FIGURA 18.15** Três rotas de osmorregulação distintas nas células-guarda. As setas escuras identificam os principais passos metabólicos de cada rota que levam à acumulação de solutos osmoticamente ativos nas células-guarda. (A) Potássio e seus contra-íons. Potássio e cloro são absorvidos em um processo de transporte secundário operado por um gradiente de prótons; malato é formado a partir da hidrólise do amido. (B) Acumulação de sacarose a partir da hidrólise do amido. (C) Acumulação de sacarose a partir da fixação fotossintética do carbono. A possível assimilação da sacarose apoplástica é também indicada (Talbott e Zeiger, 1998).

FIGURA 18.17 A luz azul estimula a acumulação de antocianinas (A) e a inibição do alongamento do caule (B) em plântulas transgênicas e mutantes de *Arabidopsis*. Os gráficos de barra mostram um fenótipo transgênico superexpressando o gene que codifica o CRY1 (CRY1 OE), o tipo selvagem (WT) e os mutantes *cry1*. A resposta melhorada à luz azul, da planta transgênica superexpressando o gene que codifica CRY1, demonstra o importante papel deste produto gênico na estimulação da biossíntese de antocianina e inibição do alongamento do caule (Ahmad e cols., 1998).

Os criptocromos estão envolvidos na inibição do alongamento do caule

O mutante *hy4* de *Arabidopsis* não mostra a inibição do alongamento do hipocótilo, estimulada pela luz azul e já descrita neste capítulo. Como resultado desse defeito genético, as plantas *hy4* mostram hipocótilos alongados, quando irradiadas com luz azul. O isolamento do gene HY4 mostrou que ele codifica uma proteína de 75 kDa com uma homologia de seqüência significante ao DNA microbial **fotoliase**, uma enzima ativada pela luz azul que repara dímeros de pirimidina, em DNA formado como resultado da exposição à radiação ultravioleta (Ahmad e Cashmore, 1993). Em vista dessa similaridade de seqüência, a proteína hy4, mais tarde redenominada **criptocromo 1 (cry1)**, foi proposta como um fotorreceptor de luz azul responsável pela mediação da inibição do alongamento do caule.

As fotoliases são pigmentos protéicos que contêm uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD; ver Figura 11.2B) e uma pterina. As **pterinas**, derivadas da pteridina, absorvem luz e em geral funcionam como pigmentos em insetos, peixes e aves (ver Capítulo 12, para a estrutura da pterina). Quando expressa em *Escherichia coli*, a proteína cry1 liga FAD e uma pterina, mas não apresenta atividade de fotoliase. Não há informação disponível sobre os cromóforo(s) ligado(s) ao cry1 *in vivo* ou sobre a natureza das reações fotoquímicas envolvendo o cry1, que iniciaria a postulada cascata de transdução sensorial, mediadora das várias respostas à luz azul mediadas pelo cry1.

FIGURA 18.16 Curso diário das mudanças na abertura estomática e nos conteúdos de potássio e sacarose, das células-guarda de folhas intactas de *Vicia faba*. Os resultados obtidos indicam que as alterações no potencial osmótico, necessárias para a abertura estomática pela manhã, são mediadas pelo potássio e seus contra-íons, enquanto as mudanças que ocorrem à tarde são mediadas pela sacarose (Talbot e Zeiger, 1998).

A evidência mais importante para o papel da cry1 na inibição do alongamento do caule, mediada pela luz azul, vem de estudos com superexpressão. A superexpressão da proteína CRY1 em plantas de tabaco transgênico ou *Arabidopsis* resulta em uma inibição mais forte do alongamento do hipocótilo estimulada pela luz azul do que a verificada no tipo selvagem, bem como um aumento na produção de antocianinas, outra resposta à luz azul (Figura 18.17). Assim, a superexpressão de CRY1 causou um aumento na sensibilidade à luz azul nas plantas transgênicas. Outras respostas à luz azul, tais como o fototropismo e os movimentos estomáticos, parecem ser normais no fenótipo mutante *cry1*.

Um segundo produto gênico homólogo a CRY1, denominado CRY2, foi isolado em *Arabidopsis* (Lin, 2000). Ambos, CRY1 e CRY2, parecem estar presentes em todo o reino vegetal. Uma importante diferença entre eles é que o CRY2 é rapidamente degradado na luz, enquanto o CRY1 é estável nas plântulas cultivadas no escuro.

Plantas transgênicas que superexpressam o gene que codifica CRY2, mostram um pequeno aumento da inibição do alongamento do hipocótilo, indicando que, diferentemente de CRY1, CRY2 não tem um papel importante na inibição do alongamento do caule. Por outro lado, as plantas transgênicas que superexpressam o gene que codifica CRY2 mostram um grande aumento na expansão dos cotilédones estimulado pela luz azul, mais uma resposta à luz azul. Além disto, foi demonstrado o envolvimento de CRY1 no ajuste do relógio circadiano em *Arabidopsis* (ver Capítulo 17) e ambos, CRY1 e CRY2, participam da indução do florescimento (ver Capítulo 24). Homólogos do criptocromo foram demonstrados na regulação do relógio circadiano em *Drosophila*, ratos e humanos.

As fototropinas estão envolvidas no fototropismo e no movimento dos cloroplastos

Alguns dos mutantes de *Arabidopsis* recentemente isolados, deficientes no fototropismo do hipocótilo dependente da luz azul, têm fornecido valiosas informações sobre os eventos celulares que precedem o dobramento. Um desses mutantes, o mutante *nph1* (*non*phototropic *h*ypocotyl), foi determinado como geneticamente independente do mutante *hy4* (*cry1*) já discutido: o mutante *nph1* não possui a resposta fototrópica do hipocótilo, porém apresenta inibição do alongamento do hipocótilo estimulada pela luz azul normal, enquanto o *hy4* tem o fenótipo reverso. O gene *nph1* foi recentemente redenominado *phot1* e a proteína codificada por ele recebeu o nome de **fototropina** (Briggs e Christie, 2002).

A metade C-terminal da fototropina é uma quinase serina/treonina. A metade N-terminal contém dois domínios repetidos, de aproximadamente 100 aminoácidos cada, que possuem similaridades de seqüência com outras proteínas envolvidas na sinalização em bactérias e mamíferos. Proteínas com similaridade de seqüência com o N terminal da fototropina ligam-se a co-fatores de flavina. Tais proteínas são sensores de oxigênio em *Echerichia coli* e *Azobacter* e sensores de voltagem em canais de potássio de *Drosophila* e vertebrados.

Quando expresso em células de insetos, a metade N-terminal da fototropina liga-se a mononucleotídeos de flavina (FMN) (ver Figura 11.2B e **Ensaio 18.2 na Internet**) e mostra uma reação de autofosforilação dependente da luz azul. Essa reação se parece com a fosforilação, dependente da luz azul, de uma proteína de membrana encontrada nas regiões de crescimento de plântulas estioladas.

O genoma de *Arabidopsis* contém um segundo gene, *phot2*, o qual está relacionado com o *phot1*. O mutante *phot1* não apresenta o fototropismo do hipocótilo em resposta à luz azul de baixa intensidade (0,01 a 1 µmol m^{-2} s^{-1}), porém mantém a resposta fototrópica a intensidades mais elevadas (1 a 10 µmol m^{-2} s^{-1}). O mutante *phot2* tem uma resposta fototrópica normal, mas o mutante duplo *phot1/phot2* mostra-se severamente danificado tanto em baixa quanto em alta intensidade. Esses dados indicam que *phot1* e *phot2* estão envolvidos nas respostas fototrópicas, com o *phot2* funcionando em altas taxas de fluência luminosa.

Movimento dos cloroplastos ativado pela luz azul. As folhas mostram uma característica adaptativa que pode alterar a distribuição intracelular de seus cloroplastos, a fim de controlar a absorção de luz e prevenir o dano causado pelo excesso de luz (ver Figura 9.5). O espectro de ação para o movimento dos cloroplastos apresenta a estrutura fina dos "três dedos" típica das respostas à luz azul. Quando a radiação incidente é fraca, os cloroplastos acumulam-se nas superfícies superior e inferior das células do mesofilo (a resposta de "acumulação"; ver Figura 9.5B), maximizando, assim, a absorção de luz.

Sob luz forte, os cloroplastos movem-se para as superfícies celulares que são paralelas à luz incidente (a resposta de "evitamento"; ver Figura 9.5C), minimizando, dessa forma, a absorção de luz. Estudos recentes mostram que as células do mesofilo do mutante *phot1* têm a resposta de evitação normal e uma resposta de acumulação rudimentar. Células do mutante *phot2* mostram uma resposta de acumulação normal, mas não apresentam a resposta de evitação. As células do duplo mutante *phot1/phot2* não apresentam as respostas de acumulação ou evitação (Sakai e cols., 2001). Tais resultados indicam que o *phot2* desempenha um papel importante na resposta de evitação e que ambos, *phot1* e *phot2*, contribuem para a resposta de acumulação.

O carotenóide zeaxantina intermedeia a fotorrecepção da luz azul nas células-guarda

O carotenóide zeaxantina tem sido implicado como o fotorreceptor na abertura estomática estimulada pela luz azul. Dos Capítulos 7 e 9, sabe-se que a zeaxantina é um dos três componentes do ciclo da xantofila dos cloroplastos, o qual protege os pigmentos fotossintéticos do excesso de energia de excitação. Nas células-guarda, entretanto, as alterações no conteúdo de zeaxantina, em função da radiação incidente, são diferentes das mudanças nas células do mesofilo (Figura 18.18).

Em plantas de sol, tais como *Vicia faba*, a acumulação de zeaxantina no mesofilo inicia por volta de 200 µmol m^{-2} s^{-1} e não é possível detectar a zeaxantina pela manhã ou à tarde. Por outro lado, o conteúdo de zeaxantina nas células-guarda segue muito de perto a radiação solar incidente na superfície da folha ao longo do dia e é quase linearmente proporcional ao fluxo incidente de fótons pela manhã ou à tarde. Várias características importantes dos cloroplastos das células-guarda indicam que a função primária destes é a transdução sensorial e não a fixação do carbono (Zeiger e cols., 2002).

Fortes evidências indicam que a zeaxantia é um fotorreceptor de luz azul nas células-guarda:

- O espectro de absorção da zeaxantina (Figura 18.19) aproxima-se muito do espectro de ação para a abertura estomática estimulada pela luz azul (ver Figura 18.11).
- Nos cursos diários da abertura estomática em folhas intactas cultivadas em casa de vegetação, a radiação incidente, o conteúdo de zeaxantina das células-guarda e as aberturas estomáticas estão intimamente relacionados (ver Figura 18.18).
- A sensibilidade à luz azul das células-guarda aumenta em função de sua concentração de zeaxantina. Experimentalmente, a concentração de zeaxantina nas células-guarda pode ser variada com aumentos da taxa de fluência de luz vermelha. Quando as células-guarda de epidermes isoladas iluminadas com taxas de fluência cada vez maiores de luz vermelha são expostas à luz azul, a abertura estomática estimulada pela luz azul resultante é linearmente relacionada à taxa de fluência da irradiação de fundo com luz vermelha (ver o tratamento do tipo selvagem na Figura 18.20) e ao conteúdo de zeaxantina (Srivastava e Zeiger, 1995b). A mesma relação entre a luz vermelha de fundo, conteúdo de zeaxantina e sensibilidade à luz azul foi detectada no fototropismo estimulado pela luz em coleóptilos de milho (ver **Tópico 18.4 na Internet**).
- A abertura estomática estimulada pela luz azul é completamente inibida por 3mM de ditiotreitol (DTT), e a inibição é dependente da concentração. A formação de zeaxantina é bloqueada pelo DTT, um agente redutor que reduz as ligações S-S a grupos –SH e inibem efetivamente a enzima que converte a violaxantina em zeaxantina. A especificidade da inibição da abertura estomática estimulada pela luz azul pelo DTT e sua dependência na concentração indicam que a zeaxantina das células-guarda é necessária para a resposta estomática à luz azul.

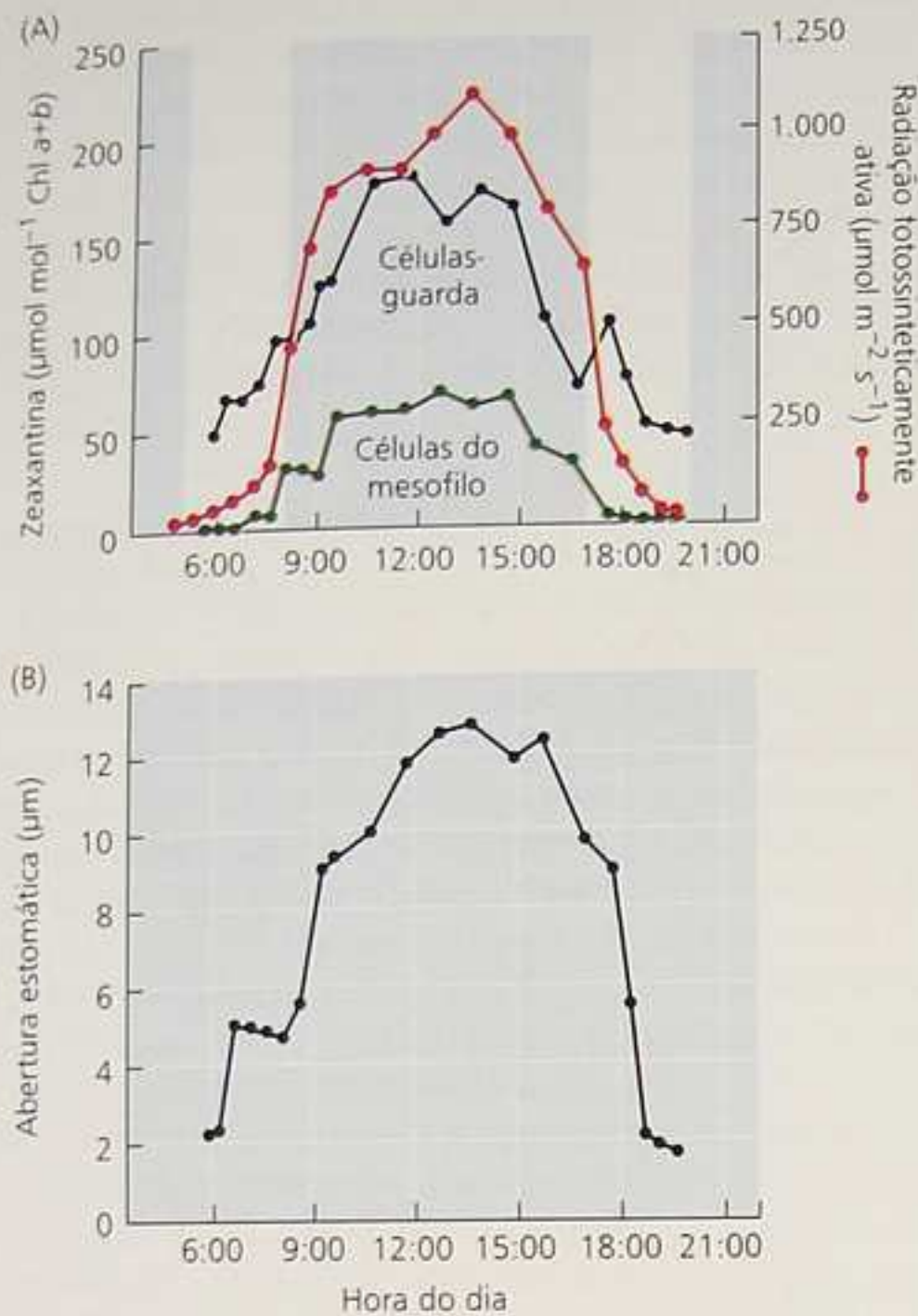



FIGURA 18.18 O conteúdo de zeaxantina das células-guarda segue de perto a radiação fotossinteticamene ativa e as aberturas estomáticas. (A) Curso diário da radiação fotossinteticamente ativa que atinge a superfície da folha e do conteúdo de zeaxantina das células-guarda e células do mesofilo de folhas de *Vicia faba* cultivadas em casa de vegetação. As áreas brancas dentro do gráfico salientam a sensibilidade contrastante do ciclo da xantofila nos cloroplastos do mesofilo e das células-guarda sob as baixas irradiâncias que prevalecem no início e no final do dia. (B) Aberturas estomáticas nas mesmas folhas utilizadas para a medição do conteúdo celular de zeaxantina (Srivastava e Zeiger, 1995a).

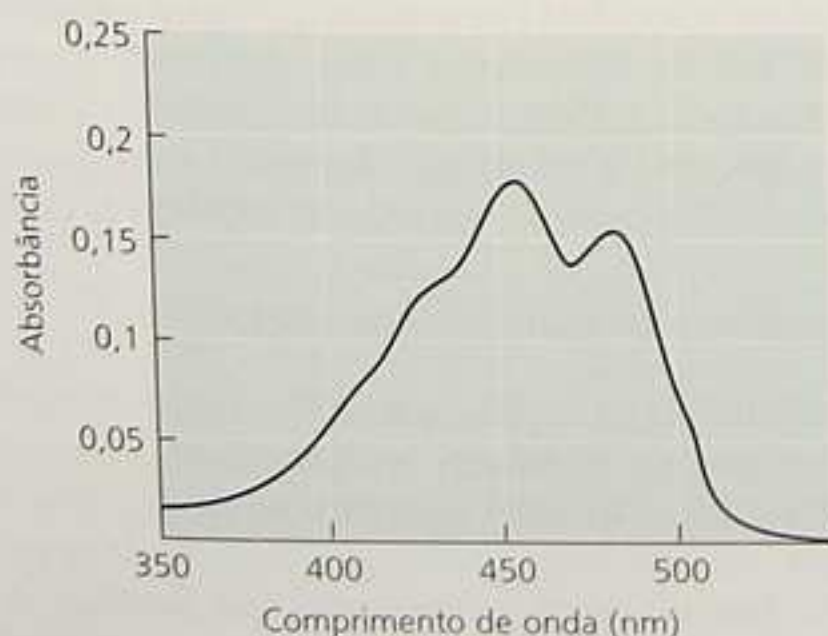



FIGURA 18.19 O espectro de absorção da zeaxantina em etanol.

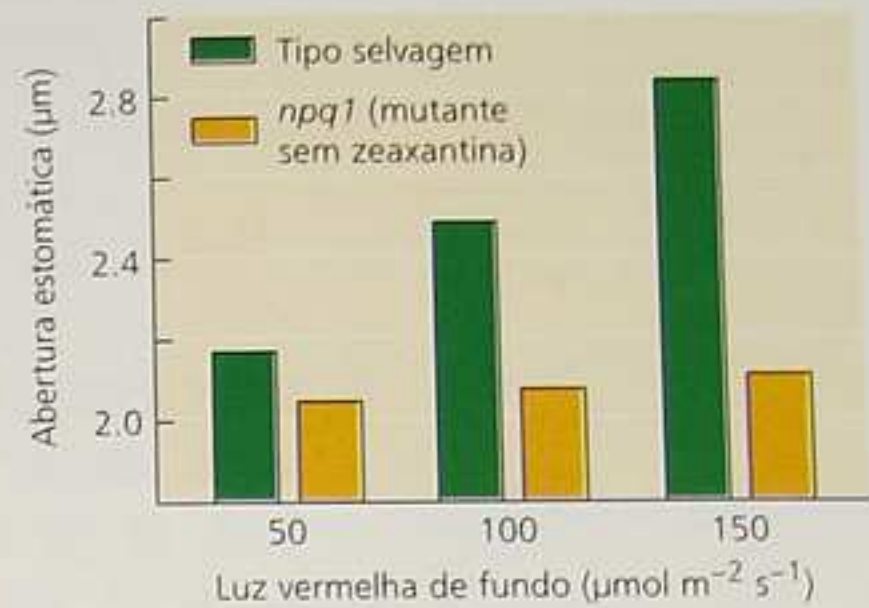



FIGURA 18.20 Respostas estomáticas à luz azul nos tipos selvagem e *npq1*, um mutante de *Arabidopsis* que não apresenta zeaxantina. Estômatos de epiderme isolada foram irradiados com luz vermelha por duas horas, e 20 µmol m^{-2} s^{-1} de luz azul foram adicionados por uma hora adicional. A abertura estomática no tipo selvagem é proporcional às taxas de fluência da luz vermelha de fundo. Por outro lado, os estômatos do *npq1* não têm esta resposta e mostraram uma abertura reduzida sob luz azul e vermelha, provavelmente mediada pela fotossíntese das células-guarda (Frechilla e cols., 1999).

- Na espécie CAM facultativa *Mesembryanthemum crystallinum* (ver Capítulos 8 e 25), a acumulação de sal altera o metabolismo do modo C_3 para CAM. No modo C_3, os estômatos acumulam zeaxantina e mostram a resposta à luz azul. A indução do CAM inibe a capacidade da células-guarda de acumular zeaxantina e responder à luz azul (Tallman e cols., 1997).

***A resposta à luz azul do mutante npq1 de* Arabidopsis.** O mutante *npq1* (do inglês, *non-photochemical quenching*) de *Arabidopsis* possui uma lesão genética na enzima que converte a violaxantina em zeaxantina (ver Figura 18.21) (Niyogi e cols., 1998). Devido a essa mutação, nem os cloroplastos das células do mesofilo nem os das células-guarda do *npq1* acumulam zeaxantina (Frechilla e cols., 1999). A existência deste mutante tornou possível testar a hipótese da zeaxantina com células-guarda onde a acumulação da zeaxantina está geneticamente bloqueada.

Uma vez que a fotossíntese nos cloroplastos das células-guarda é estimulada pela luz azul (ver Figura 18.10), um teste adequado para a resposta à luz azul no mutante *npq1* sem zeaxantina necessita de um delineamento experimental certificando que qualquer resposta observada para a luz azul seja específica para a luz azul e não mediada pela fotossíntese. Conforme foi discutido, o espectro de ação fornece um teste convincente da especificidade, porém a determinação do espectro de ação é demorada e trabalhosa.

Outra opção é testar o aumento da sensibilidade à luz azul pela luz vermelha de fundo, uma característica específica dos movimentos estomáticos estimulados pela luz azul (Assmann, 1988), discutida anteriormente. Em experimentos testando o aumento da resposta à luz azul no *npq1* pela luz vermelha de fundo, o estômato sem zeaxantina mostrou aberturas próximas à linha base em resposta à luz azul ou vermelha, operadas pela fotossíntese das células-guarda, e deixaram de mostrar qualquer aumento na resposta à luz azul.

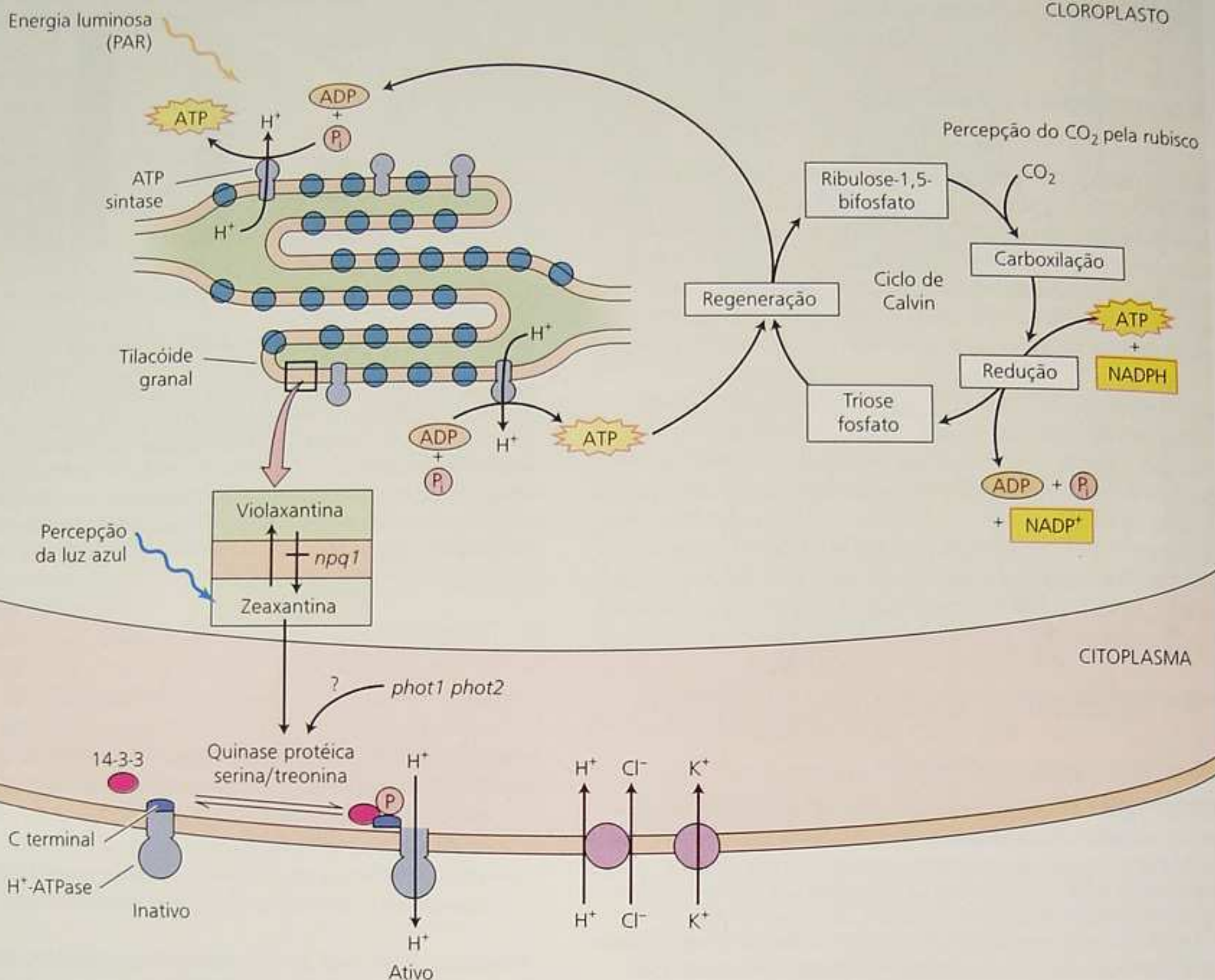



FIGURA 18.21 Uma cascata de transdução sensorial da abertura estomática estimulada pela luz azul.

A estreita relação entre a radiação solar incidente e o conteúdo de zeaxantina das células-guarda, além do papel da zeaxantina na fotorrecepção da luz azul, sugerem que o componente de luz azul da resposta estomática à luz funciona como um sensor que liga a abertura estomática ao fluxo incidente de fótons na superfície da folha. O componente fotossintético, por outro lado, poderia funcionar na ligação da resposta estomática com as taxas fotossintéticas no mesofilo (ver Capítulo 9).

O mutante* phot1/phot2 *não apresenta a abertura estimulada pela luz azul. Os estômatos do mutante duplo *phot1/phot2* não conseguem exibir uma resposta específica à luz azul, enquanto nos mutantes simples *phot1* ou *phot2* a resposta à luz azul é apenas levemente afetada (Kinoshita e cols., 2001). Tais descobertas implicam a fototropina na resposta dos estômatos à luz azul (Figura 18.21). Será de grande interesse determinar se a fototropina é o segundo fotorreceptor de luz azul nas células-guarda ou tem um papel regulador em estádios tardios da cascata de transdução sensorial.

TRANSDUÇÃO DE SINAL

As cascatas de transdução sensorial para as respostas à luz azul englobam a seqüência de eventos que ligam a absorção inicial da luz azul por um cromóforo e a expressão final das respostas à luz azul, tais como a abertura estomática e o fototropismo. Nesta seção, será discutida a informação disponível sobre as cascatas de transdução de sinal para os criptocromos, fototropinas e zeaxantina.

Os criptocromos se acumulam no núcleo

A similaridade de seqüência do cry1 e cry2 para fotoliase sugere que, assim como a fotoliase, os criptocromos iniciam suas cascatas de transdução de sinal pela redução de um cromóforo de flavina pela luz, bem como a subseqüente reação de transferência de elétrons para um aceptor de elétrons (ver Figura 11.2). Entretanto, não há evidência experimental para um envolvimento do cry1 ou cry2 nas reações redox.

Estudos recentes têm demonstrado que o cry2 e, em uma menor extensão, o cry1 acumulam-se no núcleo, sugerindo que ambas as proteínas podem estar envolvidas na regulação da expressão gênica. Porém parte da ação do criptocromo na resposta à luz azul parece ocorrer no citoplasma, porque um dos primeiros defeitos detectados nas plântulas mutantes cry1 é a ativação defeituosa dos canais de ânion na membrana plasmática. Além disto, foi demonstrado que o cry1 e cry2 interagem com o fitocromo A *in vivo* e são fosforilados pelo fitocromo A *in vitro* (ver Capítulo 17 e o **Ensaio 18.3 na Internet**).

A fototropina se liga FMN

Conforme discutido anteriormente, os produtos dos genes *phot1* e *phot2* expressos *in vitro* ligam-se ao FMN e sofrem uma fotofosforilação em resposta à luz azul. Estudos espectroscópicos recentes mostraram que as mudanças espectrais, induzidas pela luz azul, do FMN ligado à fototropina lembram aquelas típicas da ligação do FMN a um resíduo de cisteína da fototropina (Figura 18.22; ver também o **Ensaio 18.2 na Internet**) (Swartz e cols., 2001). Tal reação é revertida por um tratamento de escuro.

Esses resultados sugerem que a irradiação azul do FMN ligado à proteína em células intactas provoca uma alteração na conformação da fototropina, que dispara a autofosforilação e inicia a cascata de transdução de sinal. Os eventos celulares que seguem a autofosforilação permanecem desconhecidos.

A análise de alta resolução das alterações na taxa de crescimento mediando a inibição do alongamento do hipocótilo pela luz azul tem fornecido valiosas informações sobre as interações entre a fototropina, cry1, cry2, e o fitocromo phyA (Parks e cols., 2001). Após um retardo de 30 segundos, plântulas do tipo selvagem de *Arabidopsis* tratadas com luz azul reduzem as taxas de alongamento durante os primeiros 30 minutos, e então continuam a crescer lentamente por vários dias (Figura 18.23).

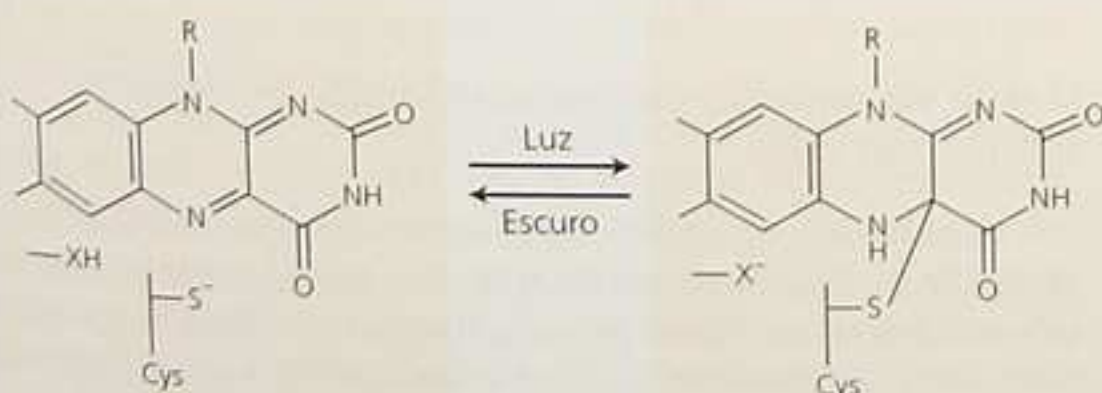
As análises da mesma resposta em mutantes *phot1*, *cry1*, *cry2* e *phyA* mostraram que a supressão do alongamento do caule pela luz azul durante o desestiolamento das plântulas é iniciado pelo *phot1*, com *cry1*, e em uma extensão limitada o *cry2*, modulando a resposta após 30 minutos. A taxa lenta de crescimento dos caules nas plântulas tratadas com luz azul é, primariamente, um resultado da ação persistente do cry1 e esta é a razão pela qual os mutantes *cry1* de *Arabidopsis* mostram um hipocótilo longo, comparado com o hipocótilo curto do tipo selvagem. Há também uma função para o fitocromo A, pelo menos nos estádios iniciais do crescimento regulado pela luz azul, pois a inibição do crescimento não progride normalmente nos mutantes *phyA*.

FIGURA 18.22 Forma proposta da formação da ligação do FMN e um resíduo de cisteína de uma proteína de fototropina sob irradiação de luz azul. XH e X^- representam um doador aceptor de prótons não-identificado (Briggs e Christie, 2002).

FIGURA 18.23 Cascata de transdução sensorial da inibição do alongamento do caule estimulada pela luz azul em *Arabidopsis*. Taxas de alongamento no escuro (0,25 mm h^{-1}) foram normalizadas para 1. Após 30 segundos do início da irradiação com luz azul, as taxas de crescimento foram reduzidas, aproximando-se de zero em 30 minutos, continuando a crescer de forma muito lenta por vários dias. Se a luz azul for aplicada a um mutante *phot1*, o crescimento no escuro não é alterado pelos primeiros 30 minutos, indicando que a inibição do alongamento nesse período de tempo está sob controle da fototropina. Experimentos similares com mutantes *cry1*, *cry2*, e *phyA* indicam que os respectivos produtos gênicos controlam as taxas de alongamento em estádios tardios (Parks e cols., 2001).

A isomerização da zeaxantina pode dar início à cascata que medeia a abertura estomática estimulada pela luz azul

Várias etapas importantes na cascata de transdução sensorial, para a abertura estomática estimulada pela luz azul já foram caracterizadas (ver Figura 18.21). O C-terminal da H^+ATPase (ver Figura 6.15) possui um domínio auto-inibitório que regula a atividade da enzima. Se tal domínio auto-inibitório for removido experimentalmente por uma protease, a H^+ATPase torna-se *irreversivelmente ativada*. Acredita-se que o domínio auto-inibitório do C-terminal reduza a atividade da enzima pelo bloqueamento do sítio catalítico. Por outro lado, a fusicocina parece ativar a enzima pelo deslocamento do domínio auto-inibitório para longe do sítio catalítico.

No momento da irradiação com a luz azul, a H^+ATPase mostra um K_m menor para o ATP e uma maior Vmax (ver Capítulo 6), indicando que a luz azul ativa a H^+ATPase. A ativação da enzima envolve a fosforilação de resíduos de serina e treonina do domínio C-terminal da H^+ATPase (Kinoshita e Shimazaki, 1999). O bombeamento de prótons e a abertura estomática estimulados pela luz azul são inibidos por inibidores das quinases protéicas, as quais podem bloquear a fosforilação da H^+ATPase. Assim como com a fusicocina, a fosforilação do domínio C-terminal parece também

deslocar o domínio auto-inibitório do C-terminal do sítio catalítico da enzima.

Uma **proteína 14-3-3** foi detectada ligando-se ao C-terminal fosforilado da H^+ATPase da célula-guarda, porém não ao ainda não-fosforilado. A família de proteínas 14-3-3 foi originalmente descoberta em tecido cerebral, sendo formada por proteínas reguladoras de ocorrência generalizada nos organismos eucariontes. Nas plantas, as proteínas 14-3-3 regulam a transcrição ligando-se a ativadores no núcleo e regulam enzimas metabólicas tais como a nitrato redutase.

Somente uma de quatro isoformas da 14-3-3 encontradas nas células-guarda liga-se à H^+ATPase, de forma que a ligação parece ser específica (Emi e cols., 2001). A mesma isoforma 14-3-3 se liga à H^+ATPase das células-guarda em resposta tanto à fusicocina quanto aos tratamentos com luz azul. A proteína 14-3-3 parece dissociar-se da H^+ATPase quando da desfosforilação do domínio C-terminal.

As taxas de bombeamento de prótons das células-guarda aumentam com a taxa de fluência da luz azul (ver Figura 18.13), enquanto o gradiente eletroquímico gerado pela bomba de prótons governa a absorção de íons para dentro das células-guarda, aumentando o turgor e a abertura estomática mediada pelo turgor. Vistos em conjunto, esses passos definem as principais etapas na transdução sensorial ligando a ativação de uma quinase protéica serina/treonina pela luz azul e a abertura estomática estimulada pela luz azul (ver Figura 18.21).

A hipótese da zeaxantina postula que a sua excitação na porção da antena dos cloroplastos das células-guarda pela luz azul dá início à cascata de transdução de sensorial que ativa a quinase serina/treonina no citosol. A isomerização é a reação fotoquímica predominante dos carotenóides, de forma que a luz azul isomerizaria a zeaxantina, enquanto alteração da conformação iniciaria a cascata de transdução.

A reversão pela luz verde da abertura estimulada pela luz azul. Uma reversão, pela luz verde, da abertura estomática estimulada pela luz azul foi recentemente descoberta. Os estômatos em epidermes isoladas abrem em resposta a um pulso de luz azul de 30 s (Figura 18.24), porém a abertura não é observada se o pulso de luz azul é seguido por um pulso de luz verde. A abertura é restabelecida se o pulso de luz verde for seguido de um segundo pulso de luz azul, em uma resposta análoga à reversibilidade vermelho/vermelho-distante das respostas do fitocromo (Frechilla e cols., 2000).

A resposta de reversibilidade azul/verde foi registrada nos estômatos de várias espécies e no fototropismo do coleóptilo estimulado pela luz azul (ver **Ensaio 18.4 na Internet**). O papel da reversão azul/verde dos movimentos estomáticos sob condições naturais ainda necessita ser estabelecido, mas poderia estar relacionado à percepção das condições ambientais, tais como sol e sombra.

O espectro de ação para a reversão, no verde, da abertura estimulada pela luz azul mostra um máximo em 540 nm e dois picos menores em 490 e 580 nm. Um espectro de ação desse tipo elimina a possibilidade de envolvimento de fitocromo ou clorofilas nesta resposta. O espectro de ação é, por outro lado, incrivelmente similar ao espectro de ação para a abertura estomática estimulada pela luz azul (ver Figura 18.11), mas deslocado para o vermelho (deslocado em direção da banda mais longa de ondas vermelhas do espectro) por aproximadamente 90 nm.

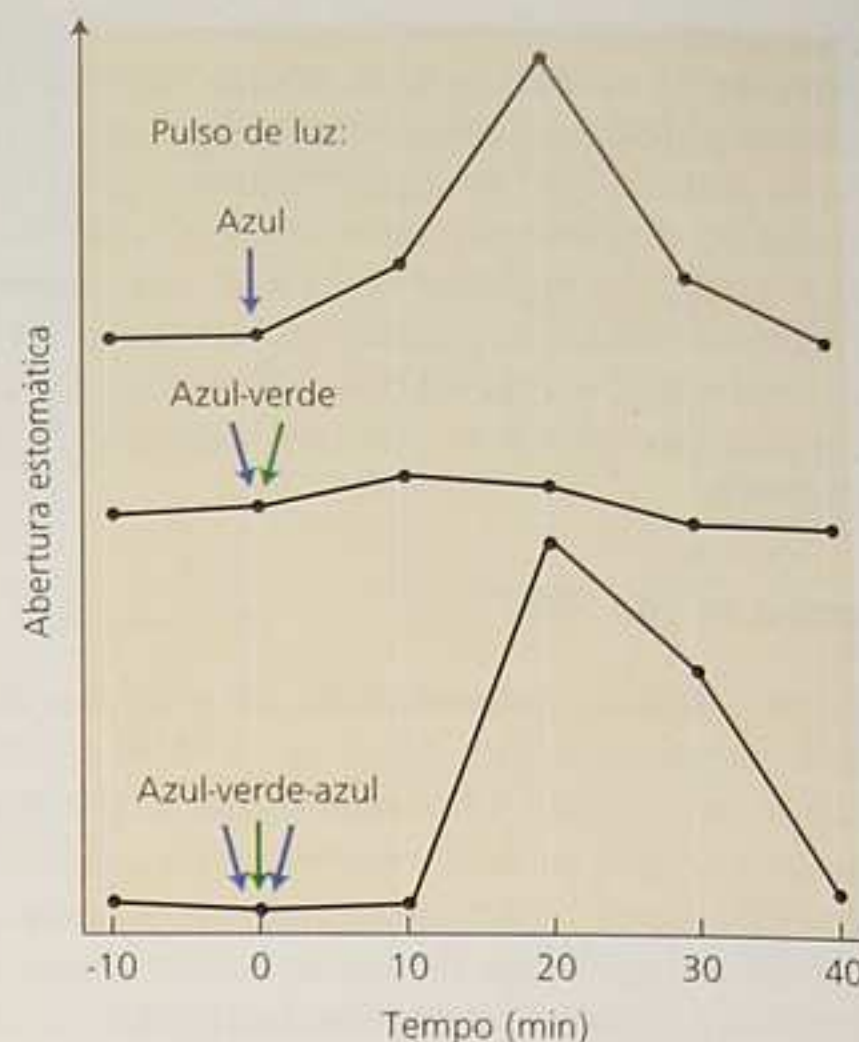



FIGURA 18.24 Reversibilidade azul/verde dos movimentos estomáticos. Os estômatos abrem-se quando iluminados com um pulso de 30 s de luz azul (1800 mmol $m^{-2} s^{-1}$) sob uma luz vermelha contínua de fundo (120 mmol $m^{-2} s^{-1}$). Um pulso de luz verde (3600 mmol $m^{-2} s^{-1}$) aplicado após o pulso de luz azul bloqueia a resposta à luz azul, e a abertura é retomada quando um segundo pulso de luz azul é aplicado após o pulso de luz verde (Frechilla e cols., 2000).

Tais deslocamentos espectrais para o vermelho foram observados quando da isomerização dos carotenóides em um ambiente protéico (ver o **Ensaio 18.4 na Internet**). Em vesículas reconstituídas contendo a proteína de ligação da clorofila *a/b* e as xantofilas zeaxantina, violaxantina e neoxantina, o espectro reversível de absorção azul/verde é associado com a isomerização da zeaxantina.

A reversão azul/verde dos movimentos estomáticos e as alterações no espectro de absorção evocadas pela luz azul e verde sugerem que um isômero *trans* da zeaxantina, fisiologicamente inativo, é convertido a um isômero *cis* pela luz azul, e a isomerização inicia a cascata de transdução sensorial. Dados disponíveis sugerem que a luz verde converte o isômero *cis* na forma *trans* fisiologicamente inativa e, assim, reverte o sinal estimulado pela luz azul. Resultados de um estudo anterior indicam ainda que, após um pulso azul, a forma *cis* lentamente reverte à forma *trans* no escuro (Iino e cols., 1985).

O ciclo da xantofila confere plasticidade às respostas estomáticas à luz

A concentração de zeaxantina nas células-guarda varia com a atividade do ciclo da xantofila. A enzima que converte a violaxantina em zeaxantina é uma proteína integral do tilacóide que apresenta um pH ótimo em 5,2 (Yamamoto, 1979). A acidificação do pH do lume estimula a formação da zeaxantina, enquanto a alcalinização do lume favorece a formação da violaxantina.

O pH do lume depende dos níveis de radiação fotossinteticamente ativa incidente (mais efetiva nos comprimentos de onda do azul e do vermelho; ver Capítulo 7), e da taxa de síntese de ATP,

que dissipa o gradiente de pH através do tilacóide. Assim, a atividade fotossintética no cloroplasto da célula-guarda, pH do lume, conteúdo de zeaxantina, sensibilidade à luz azul e abertura estomática estão intimamente ligados.

Algumas das propriedades únicas dos cloroplastos das células-guarda parecem ser otimamente adaptadas para a sua função de transdução sensorial. Comparados aos seus equivalentes do mesofilo, os cloroplastos das células-guarda são enriquecidos em fotossistema II e possuem taxas de transporte de elétrons extremamente altas e baixas taxas de fixação fotossintética de carbono (Zeiger, 2002). Essas propriedades favorecem a acidificação do lume em baixos fluxos de fótons e explicam a formação de zeaxantina nos cloroplastos das células-guarda ao alvorecer (ver Figura 18.18).

A regulação do conteúdo de zeaxantina pelo pH do lume e a estreita ligação entre o pH do lume e a atividade do ciclo de Calvin nos cloroplastos das células-guarda (ver Figura 18.21) sugerem que a zeaxantina pode também operar como um sensor de CO_2 nas células-guarda (ver **Ensaio 18.5 na Internet**).

O incrível progresso alcançado pelas recentes descobertas na biologia molecular das respostas à luz azul aumentou significativamente nosso conhecimento sobre o assunto. A identificação de criptocromos, fototropinas e zeaxantina como possíveis fotorreceptores de luz azul em células vegetais estimulou um grande interesse neste aspecto da fotobiologia das plantas. Trabalhos em desenvolvimento, além de futuras pesquisas, estão tentando responder importantes questões em aberto, tais como a seqüência detalhada das cascatas de transdução sensorial e a localização e a composição precisa dos pigmentos protéicos envolvidos. Estudos em andamento sobre o assunto garantem virtualmente um progresso rápido.

RESUMO

As plantas utilizam a luz como uma fonte de energia e um sinal que fornece informação sobre seu ambiente. Uma grande família de respostas à luz azul é utilizada para perceber a quantidade e a direção da luz. Tais sinais de luz azul são transduzidos em processos elétricos, metabólicos e genéticos que permitem às plantas alterarem o crescimento, o desenvolvimento e a função, a fim de aclimatarem-se às mudanças nas condições ambientais. As respostas à luz azul incluem o fototropismo, movimentos estomáticos, inibição do alongamento do caule, ativação de genes, biossíntese de pigmentos, acompanhamento do sol pelas folhas e o movimento dos cloroplastos dentro das células.

Respostas específicas à luz azul podem ser distinguidas de outras respostas que possuem alguma sensibilidade à luz azul por um espectro de ação característico com "três dedos" na região dos 400 aos 500 nm.

A fisiologia das respostas à luz azul varia muito. No fototropismo, os caules crescem em direção às fontes de luz unilaterais por crescimento assimétrico no lado sombreado. Na inibição do alongamento dos caules, a percepção da luz azul despolariza o potencial de membrana das células em alongamento e a taxa de alongamento decresce rapidamente. Na ativação gênica, a luz azul estimula a transcrição e a tradução, levando à acumulação dos produtos gênicos que são necessários para a resposta morfogenética à luz.

Os movimentos estomáticos estimulados pela luz azul são operados por alterações dependentes da luz azul na osmorregulação ds células-guarda. A luz azul estimula uma H^+ATPase na membrana plasmática da célula-guarda e o bombeamento de prótons pela membrana resultante gera um gradiente eletroquímico que fornece a força operacional para a absorção de íons. A luz azul também estimula a degradação do amido e a biossíntese do malato. A acumulação de solutos dentro das células-guarda leva à abertura estomática. As células-guarda também utilizam a sacarose como um dos principais solutos osmoticamente ativos e a qualidade da luz pode alterar a atividade de diferentes rotas de osmorregulação que modulam os movimentos estomáticos.

Cry1 e *cry2* são dois genes de *Arabidopsis* envolvidos na inibição dependente da luz azul do alongamento do caule, da expansão dos cotilédones, da síntese de antocianinas, do controle do florescimento e do ajuste dos ritmos circadianos. Foi proposto que CRY1 e CRY2 são apoproteínas de pigmentos protéicos contendo flavina, as quais medeiam a fotorrecepção da luz azul.

Os produtos dos genes cry1 e cry2 têm uma similaridade de seqüência com a fotoliase, porém não apresentam atividade de fotoliase. A proteína cry1 e, em uma menor extensão, a cry2 acumulam-se no núcleo e podem estar envolvidas na expressão gênica. A proteína cry1 também regula a atividade dos canais de ânions na membrana plasmática.

A proteína fototropina possui um papel principal na regulação do fototropismo. A metade C-terminal da fototropina é uma quinase serina/treonina e a metade N-terminal possui dois domínios de ligação de flavinas. *In vitro*, a fototropina liga a flavina FMN e se autofosforila em resposta à luz azul. Mutantes chamados *phot1* e *phot2* são defeituosos no fototropismo e no movimento dos cloroplastos. O mutante duplo *phot1/phot2* não apresenta a abertura dos estômatos estimulada pela luz azul.

O carotenóide do cloroplasto, zeaxantina, tem sido implicado na fotorrecepção da luz azul nas células-guarda. A abertura estomática estimulada pela luz azul é bloqueada se a acumulação de zeaxantina nas células-guarda é evitada por meios genéticos ou bioquímicos. A manipulação do conteúdo de zeaxantina nas células-guarda possibilita a regulação de sua resposta à luz azul. A cascata de transdução de sinal para a resposta à luz azul das células-guarda compreende a percepção da luz azul nos cloroplastos dessas células, a transdução do sinal de luz azul pelo envoltório do cloroplasto, a ativação da H^+ATPase, o acúmulo de turgor e a abertura estomática.

Material da Internet

Tópicos da Internet

18.1 Osmorregulação das células-guarda e um interruptor metabólico ativado pela luz azul
A luz azul controla as principais rotas osmorreguladoras nas células-guarda e nas algas unicelulares

18.2 Notas históricas sobre a pesquisa dos fotorreceptores da luz azul
Os carotenóides e as flavinas têm sido os principais candidatos ao fotorreceptor de luz azul

18.3 Comparando flavinas e carotenóides
Fotorreceptores flavinas e carotenóides possuem propriedades funcionais contrastantes

18.4 O clorolasto do coleóptilo
Cloroplastos de coleóptilo e células-guarda especializam-se em transdução sensorial.

Ensaios da Internet

18.1 Fotossíntese das células-guarda
A fotossíntese nas células-guarda mostra características de regulação únicas

18.2 Fototropinas
As fototropinas regulam várias respostas das plantas à luz

18.3 A transdução sensorial da inibição do alongamento do caule pela luz azul
A regulação do alongamento do caule pela luz azul tem importância fundamental para o desenvolvimento da planta

18.4 A reversibilidade azul/verde da resposta do estômato à luz azul
A reversão azul/verde dos movimentos estomáticos é uma resposta fotobiológica marcante

18.5 Percepção de zeaxantina e CO_2 nas células-guarda
A relação funcional entre a atividade do ciclo de Calvin e o conteúdo de zeaxantina das células-guarda liga a luz azul e a percepção do CO_2 durante os movimentos estomáticos.

Referências bibliográficas

Ahmad, M., and Cashmore, A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue light photoreceptor. *Nature* 366:162-166.

Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O., and Cashmore, A. R. (1998) Cryptochrome blue light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392: 720-723.

Amodeo, G., Srivastava, A., and Zeiger, E. (1992) Vanadate inhibits blue light-stimulated swelling of *Vicia* guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 100: 1567-1570.

Assmann, S. M. (1988) Enhancement of the stomatal response to blue light by red light, reduced intercellular concentrations of carbon dioxide and low vapor pressure differences. *Plant Physiol.* 87: 226-231.

Assmann, S. M., Simoncini, L., and Schroeder, J. I. (1985) Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 318: 285-287.

Briggs, W R., and Christie, J. M. (2002) Phototropins 1 and 2: Versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 7: 204-210.

Cerda-Olmedo, E., and Lipson, E. D. (1987) *Phycomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Cosgrove, D. J. (1994) Photomodulation of growth. In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 631-658.

Dietrich, P, Sanders, D., and Hedrich, R. (2001) The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. *J. Exp. Bot.* 52:1959-1967.

En-d, T., Kinoshita, T., and Shimazaki, K. (2001) Specific binding of vf14-3-3a isoform to the plasma membrane H+-ATPase in response to blue light and fusicoccin in guard cells of broad bean. *Plant Physiol.* 125: 1115-1125.

Firn, R. D. (1994) Phototropism. In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 659-681.

Frechllla, S., Talbott, L. D., Bogomolni, R. A., and Zeiger, E. (2000) Reversal of blue light-stimulated stomatal opening by green light. *Plant Cell Physiol.* 41:171-176.

Frechilla, S., Zhu, J., Talbott, L. D., and Zeiger, E. (1999) Stomata from npql, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant Cell Physiol.* 40: 949-954.

Horwitz, B. A. (1994) Properties and transduction chains of the UV and blue light photoreceptors. In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed., R. E. Kendrick and G. H. M. Kronenberg, eds., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 327-350.

Iino, M., Ogawa, T., and Zeiger, E. (1985) Kinetic properties of the blue light response of stomata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8019-8023.

Karlsson, P. E. (1986) Blue light regulation of stomata in wheat seedlings. II. Action spectrum and search for action dichroism. *Physiol. Plant.* 66: 207-210.

Kinoshita, T., and Shimazaki, K. (1999) Blue light activates the plasma membrane H+-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *EMBO J.* 18: 5548-5558.

Kinoshita, T., and Shimazaki, K. (2001) Analysis of the phosphorylation level in guard-cell plasma membrane H+-ATPase in response to fusicoccin. *Plant Cell Physiol.* 42: 424-432.

Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., and Shimazaki, K. (2001) photl and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414: 656-660.

Lin, C. (2000) Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 5: 337-342.

Matters, G. L., and Beale, S. I. (1995) Blue-light-regulated expression of genes for two early steps of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 109: 471-479.

Niyogi, K. K., Grossman, A. R., and Bjorkman, O. (1998) *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell 10:* 1121-1134.

Outlaw, W. H., Jr. (1983) Current concepts on the role of potassium in stomatal movements. *Physiol. Plant.* 59: 302-311.

Parks, B. M., Cho, M. H., and Spalding, E. P (1998) Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in Arabidopsis seedlings. *Plant Physiol.* 118: 609-615.

Parks, B. M., Folta, K. M., and Spalding, E. P (2001) Photocontrol of stem growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 436-440.

Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., and Okada, K. (2001) Arabidopsis nphl and npll: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 6969-6974.

Schroeder, J. L, Allen, G. J., Hugouvieux, V, Kwak, J. M., and Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.

Schwartz, A., and Zeiger, E. (1984) Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* 161:129-136.

Senger, H. (1984) *Blue Light Effects in Biological Systems*. Springer, Berlin.

Serrano, E. E., Zeiger, E., and Hagiwara, S. (1988) Red light stimulates an electrogenic proton pump in *Vicia* guard cell protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 436-440.

Shimazaki, K., hno, M., and Zeiger, E. (1986) Blue light-dependent proton extrusion by guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature* 319: 324-326.

Spalding, E. P, and Cosgrove, D. J. (1989) Large membrane depolarization precedes rapid blue-light induced growth inhibition in cucumber. *Planta* 178: 407-410.

Srivastava, A., and Zeiger, E. (1995a) Guard cell zeaxanthin tracks photosynthetic active radiation and stomatal apertures in *Vicia faba* leaves. *Plant Cell Environ.* 18: 813-817.

Srivastava, A., and Zeiger, E. (1995b) The inhibitor of zeaxanthin formation, dithiothreitol, inhibits blue-light-stimulated stomatal opening in *Vicia faba*. *Planta* 196: 445-449.

Swartz, T. E., Corchnoy S. B., Christie, J. M., Lewis, J. W., Szundi, I., Briggs, W. R., and Bogomolni, R. A. (2001) The photocycle of a flavin-binding domain of the blue light photoreceptor phototropin. *J. Biol. Chem.* 276: 36493-36500.

Talbott, L. D., and Zeiger, E. (1998) The role of sucrose in guard cell osmoregulation. *J. Exp. Bot* 49: 329-337.

Talbott, L. D., Srivastava, A., and Zeiger, E. (1996) Stomata from growth-chamber-grown *Vicia faba* have an enhanced sensitivity to CO_2. *Plant Cell Environ.* 19:1188-1194.

Capítulo

19 Auxina: o hormônio de crescimento

A FORMA E A FUNÇÃO dos organismos multicelulares não poderiam ser mantidas sem uma eficiente comunicação entre células, tecidos e órgãos. Nos vegetais superiores, a regulação do metabolismo, o crescimento e a morfogênese muitas vezes dependem de sinais químicos de uma parte da planta para outra. Está idéia surgiu no século XIX com o botânico alemão Julius von Sachs (1832-1897).

Sachs propôs que mensageiros químicos são responsáveis pela formação e pelo crescimento de diferentes órgãos vegetais. Sugeriu também que os fatores externos, como a gravidade, poderiam afetar a distribuição dessas substâncias na planta. Embora Sachs não soubesse a identidade desses mensageiros químicos, suas idéias levaram à sua descoberta definitiva desses compostos.

Muitos dos conceitos atuais sobre comunicação intercelular em plantas derivaram de estudos semelhantes em animais. Nestes mensageiros químicos que funcionam como mediadores na comunicação intercelular são chamados de **hormônios**, os quais interagem com proteínas especificas, denominadas *receptores*.

A maioria dos hormônios animais é sintetizada e secretada em uma parte do corpo e transferida para os sítios-alvo específicos em outra parte do corpo através da corrente sangüínea. Os hormônios animais dividem-se em quatro categorias gerais: proteínas, pequenos peptídeos, derivados de aminoácidos e esteróides.

Os vegetais também produzem moléculas sinalizadoras, os *hormônios*, responsáveis por efeitos marcantes no desenvolvimento em concentrações bastante pequenas. Até pouco tempo, acreditava-se que o desenvolvimento vegetal era regulado por apenas cinco tipos de hormônios: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico. Entretanto, atualmente, há fortes evidências indicando a existência de hormônios vegetais esteróides, os brassinoesteróides, que produzem uma ampla gama de efeitos morfológicos no desenvolvimento vegetal (os brassinoesteróides, como hormônios vegetais, são discutidos no **Ensaio 19.1 na Internet**).

Várias outras moléculas sinalizadoras, participantes nos processos de resistência a patógenos e de defesa contra herbívoros, também têm sido identificadas, incluindo o ácido jasmônico, o ácido salicílico e o polipeptídeo sistemina (ver Capítulo 13). Assim, o número e os tipos de hormônios, além dos agentes sinalizadores semelhantes a hormônios nos vegetais, continuam aumentando.

O primeiro hormônio vegetal a ser considerado é a auxina, merecedora de lugar de destaque em qualquer discussão a respeito de hormônios vegetais, pois foi o primeiro hormônio de crescimento descoberto em plantas, além de muitos trabalhos pioneiros na fisiologia do mecanismo de expansão celular terem sido realizados em relação à ação da auxina.

Além disso, a auxina e a citocinina diferem dos demais hormônios vegetais e agentes de sinalização em um aspecto importante: elas são necessárias para a viabilidade. Conseqüentemente, nenhum mutante com deficiência em auxina ou citocinina tem sido encontrado, sugerindo que as mutações que eliminam tais hormônios são letais. Enquanto os demais hormônios vegetais parecem agir como chaves liga-desliga, reguladoras dos processos específicos do desenvolvimento, a auxina e a citocinina parecem ser necessárias, em certo nível, mais ou menos continuamente.

A discussão sobre auxinas será iniciada com um breve histórico da sua descoberta, seguindo a descrição das suas estruturas químicas, os métodos usados para detectar auxinas nos tecidos vegetais e as rotas biossintéticas das auxinas, bem como a natureza polar do transporte dessa classe de hormônio. Então, serão revisados os vários processos controlados pela auxina, como o alongamento do caule, a dominância apical, a formação da raiz, o desenvolvimento de frutos e o crescimento orientado ou tropismo. Por último, será analisado o mecanismo de crescimento induzido por auxina nos níveis celular e molecular.

O SURGIMENTO DO CONCEITO DE AUXINA

Durante o final do século XIX, Charles Darwin e seu filho Francis estudaram o fenômeno do crescimento vegetal envolvendo tropismos. Um dos seus interesses era a curvatura da planta em direção à luz. O fenômeno, provocado pelo crescimento diferencial, é chamado de **fototropismo**. Em alguns experimentos, os Darwins utilizaram plântulas de alpiste (*Phalaris canariensis*), nas quais, como em muitas outras gramíneas, as folhas mais jovens são revestidas por um órgão protetor chamado de **coleóptilo** (Figura 19.1).

Os coleóptilos são muito sensíveis à luz, especialmente à luz azul (ver Capítulo 18). Se forem iluminados unilateralmente com um pulso curto de luz azul fraca, eles se curvam (crescem) em direção à fonte de luz, em uma hora. Os Darwins descobriram que o ápice do coleóptilo percebia a luz, pois, se fosse coberto com papel alumínio, a curvatura do coleóptilo não era observada. Porém, a região do coleóptilo que era responsável pela curvatura em direção à luz, a **zona de crescimento**, localizava-se vários milímetros abaixo do ápice.

Assim, concluíram que algum tipo de sinal era produzido no ápice, deslocava-se até a zona de crescimento, ocasionando o crescimento mais rápido do lado sombreado do que o lado iluminado. Os resultados desses experimentos foram publicados em 1881, em um livro notável, intitulado *The Power of Moviment in Plants*.

Seguiu-se, então, um longo período de experimentação sobre a natureza do estímulo do crescimento em coleóptilos. A pesquisa culminou com a demonstração em 1926, por Frits Went, da presença de um composto promotor de crescimento no ápice dos coleóptilos de aveia (*Avena sativa*). Já havia sido demonstrado que se a extremidade do coleóptilo fosse retirada, o crescimento desse órgão cessava. Alguns pesquisadores anteriores tentaram isolar e identificar esse composto, macerando o coleóptilo e testando a atividade dos extratos. Essa abordagem falhou, porque a maceração liberava, no extrato, substâncias inibidoras, que normalmente encontravam-se em diferentes compartimentos na célula.

A maior descoberta de Went foi evitar a maceração, permitindo que o composto se difundisse dos ápices removidos de coleóptilos diretamente em blocos de gelatina. Se colocados assimetricamente sobre um coleóptilo decapitado, tais blocos poderiam ser testados quanto à sua capacidade de provocar curvatura na ausência de uma fonte de luz unilateral (ver Figura 19.1). Pelo fato de promover o crescimento das seções de coleóptilo (Figura 19.2), essa substância foi chamada de **auxina**, termo originário do grego *auxein*, cujo significado é "aumentar" ou "crescer".

BIOSSÍNTESE E METABOLISMO DA AUXINA

Os estudos de Went com blocos de ágar demonstraram inequivocamente que a "influência" promotora do crescimento, que se difundia a partir do ápice do coleóptilo, era uma substância química. O fato de ser produzida em um local e transportada em pouca quantidade para seu sítio de ação qualificou essa substância como um autêntico hormônio vegetal.

Nos anos seguintes, a identidade química da "substância de crescimento" foi determinada e, devido aos seus usos potenciais na agricultura, muitas moléculas análogas foram testadas. Esse teste levou a generalizações sobre as exigências químicas para a atividade da auxina. Em paralelo com tais estudos, a técnica de difusão nos blocos de ágar foi sendo aplicada para estudar o problema do transporte da auxina. Os avanços tecnológicos, principalmente o uso de isótopos como marcadores, permitiram aos bioquímicos vegetais elucidar as vias de síntese e de degradação da auxina.

A discussão inicia com a natureza química da auxina, continuando com a descrição de sua biossíntese, transporte e metabolismo. Os métodos analíticos cada vez mais eficientes e a aplicação das técnicas de biologia molecular têm permitido aos pesquisadores identificar os precursores da auxina e estudar seu metabolismo e sua distribuição no vegetal.

A principal auxina nos vegetais superiores é o ácido indol-3-acético

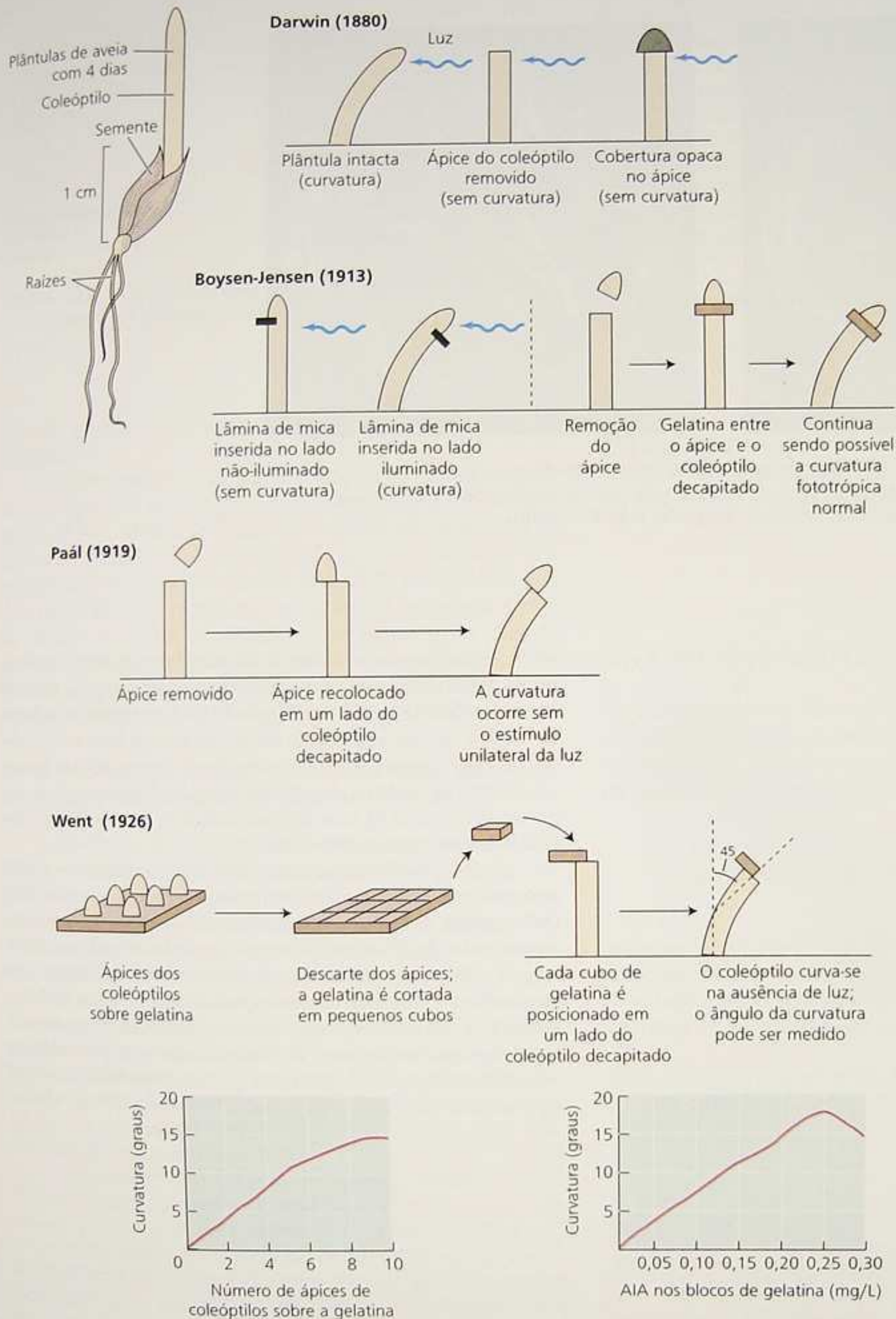
Em meados de 1930 foi determinado que a auxina era o **ácido indol-3-acético (AIA)**. Mais tarde, várias outras auxinas foram descobertas nos vegetais superiores (Figura 19.3), mas o AIA é, sem dúvida, a mais abundante e a de maior relevância fisiológica. Com base na estrutura relativamente simples do AIA, os laboratórios acadêmicos e industriais foram capazes de sintetizar uma grande variedade de moléculas com atividade auxínica. Algumas dessas moléculas são utilizadas como herbicidas na horticultura e na agricultura (Figura 19.4) (para auxinas sintéticas adicionais, ver **Tópico 19.1 na Internet**).

Uma definição inicial de auxina incluía todas as substâncias químicas sintéticas que estimulavam o alongamento de coleóptilos e segmentos de caules. Entretanto, as auxinas afetam muitos processos do desenvolvimento, além do alongamento celular. Assim, auxinas podem ser definidas como compostos com atividade biológica similar àquela do AIA, incluindo a capacidade de promover o alongamento de coleóptilos de segmentos de caules, divisão celular em culturas de calos em presença de citocininas, formação de raízes adventícias em folhas ou caules excisados e

Plântulas de aveia com 4 dias
Coleóptilo
Semente
1 cm
Raízes

Darwin (1880)

Luz

Plântula intacta (curvatura)
Ápice do coleóptilo removido (sem curvatura)
Cobertura opaca no ápice (sem curvatura)

A partir dos experimentos de fototropismo em coleóptilos, Darwin concluiu, em 1880, que um estímulo de crescimento é produzido no ápice do coleóptilo e transmitido para a zona de crescimento.

Boysen-Jensen (1913)

Lâmina de mica inserida no lado não-iluminado (sem curvatura)
Lâmina de mica inserida no lado iluminado (curvatura)
Remoção do ápice
Gelatina entre o ápice e o coleóptilo decapitado
Continua sendo possível a curvatura fototrópica normal

Em 1913, P. Boysen-Jensen descobriu que o estímulo do crescimento passava pela gelatina, mas não através de barreiras impermeáveis à água, como a mica.

Paál (1919)

Ápice removido
Ápice recolocado em um lado do coleóptilo decapitado
A curvatura ocorre sem o estímulo unilateral da luz

Em 1919, A. Paál forneceu evidências de que o estímulo promotor de crescimento produzido no ápice do coleóptilo era de natureza química.

Went (1926)

Ápices dos coleóptilos sobre gelatina
Descarte dos ápices; a gelatina é cortada em pequenos cubos
Cada cubo de gelatina é posicionado em um lado do coleóptilo decapitado
45
O coleóptilo curva-se na ausência de luz; o ângulo da curvatura pode ser medido

Em 1926, F.W. Went demonstrou que a substância ativa em promover o crescimento pode se difundir em cubos de gelatina. Ele descobriu, ainda, um ensaio de curvatura de coleóptilo para análise quantitativa de auxina.

Curvatura (graus)
20
15
10
5
0 2 4 6 8 10
Número de ápices de coleóptilos sobre a gelatina

Curvatura (graus)
20
15
10
5
0,05 0,10 0,15 0,20 0,25 0,30
AIA nos blocos de gelatina (mg/L)

FIGURA 19.1 Resumo dos primeiros experimentos realizados na pesquisa com auxina.

(A) (B)

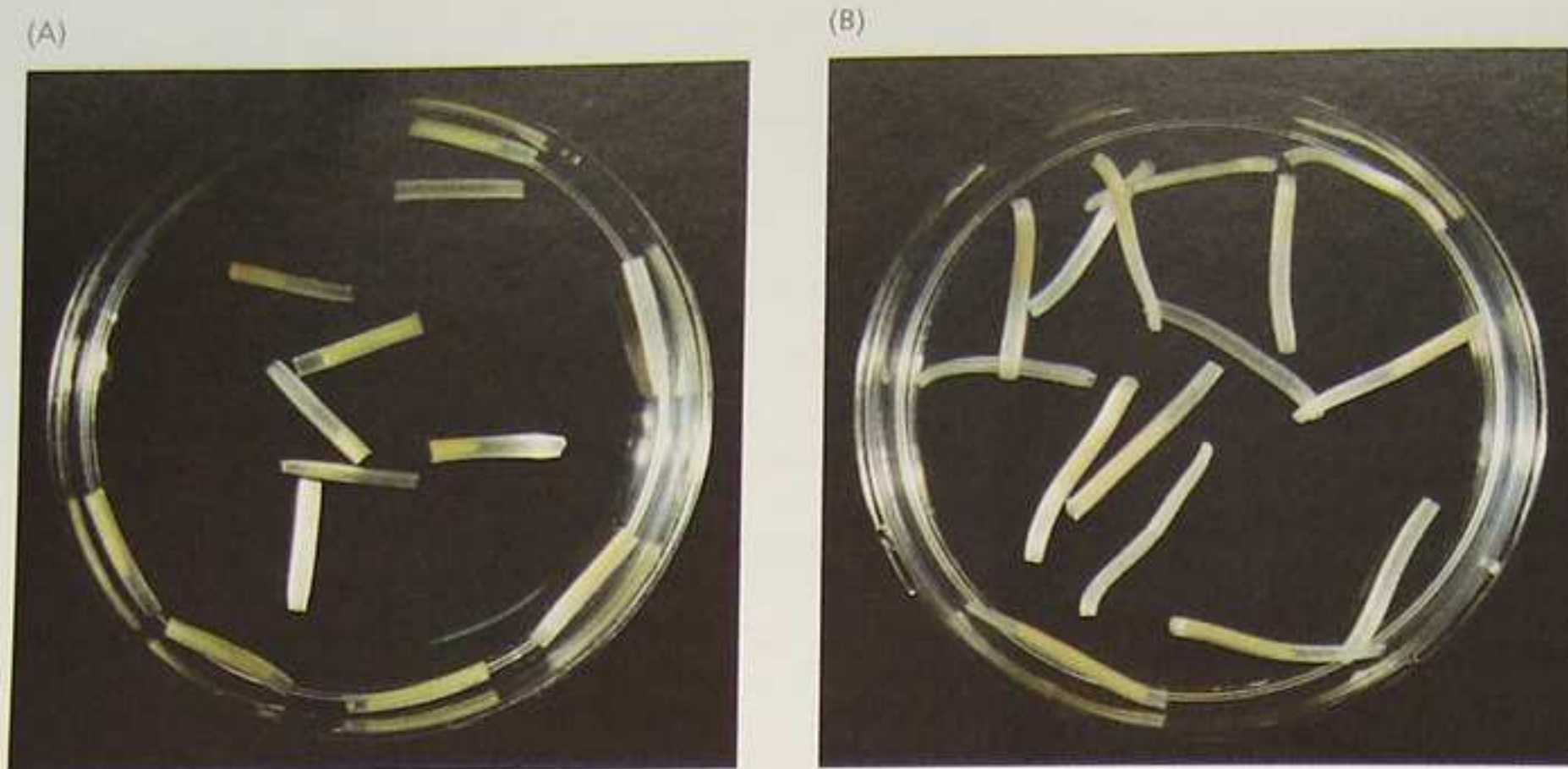



FIGURA 19.2 A auxina estimula o alongamento de segmentos de coleóptilo de aveia. Tais segmentos foram incubados por 18 horas em água (A) ou auxina (B). O tecido amarelo dentro do coleóptilo translúcido corresponde às folhas primárias (fotografias © M. B. Wilkins).

outros fenômenos do desenvolvimento relacionados com a ação do AIA.

Embora sejam quimicamente diversas, uma característica comum de todas as auxinas ativas é a distância molecular de cerca de 0,5 nm entre uma pequena carga positiva no anel aromático e um grupo carboxila negativamente carregado (ver **Tópico 19.2 na Internet**).

As auxinas podem ser quantificadas em amostras biológicas

Dependendo da informação de que o pesquisador necessita, a quantidade e/ou a identificação de auxinas em amostras biológicas podem ser determinadas por bioensaios, espectrometria de massas ou ELISA (do inglês, *Enzime-linked immunosorbent assay*) (ver **Tópico 19.3 na Internet**).

Um **bioensaio** é a medida do efeito de uma substância biologicamente ativa, conhecida ou não, sobre um material vivo. No seu trabalho pioneiro, há mais de 60 anos, Went utilizou coleóptilos de aveia (*Avena sativa*) em uma técnica denominada **teste de curvatura de coleóptilos** (ver Figura 19.1). A curvatura do coleóptilo ocorria devido ao aumento da auxina em um lado, estimulando o alongamento celular, e à diminuição da auxina no lado oposto (decorrente da ausência da extremidade do coleóptilo), provocando um decréscimo na taxa de crescimento — um fenômeno chamado de **crescimento diferencial.**

Went descobriu que poderia estimar a quantidade de auxina em uma amostra, medindo o resultado da curvatura do coleóptilo. Os bioensaios de auxina são utilizados até hoje para detectar a presença de atividade auxínica em uma amostra. O ensaio da curvatura do coleóptilo de aveia é uma medida sensível da atividade da auxina (ele é eficaz para concentrações de AIA de cerca de 0,02 a 0,2 mg.L^{-1}). Um outro bioensaio mede as mudanças induzidas pela auxina no crescimento linear de coleóptilos de aveia flutuando em solução (ver Figura 19.2). Ambos os bioensaios podem determinar a presença de auxina em uma amostra, mas não podem ser utiliza-

Ácido indol-3-acético (AIA)

Ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-AIA)

Ácido indol-3-butírico (AIB)

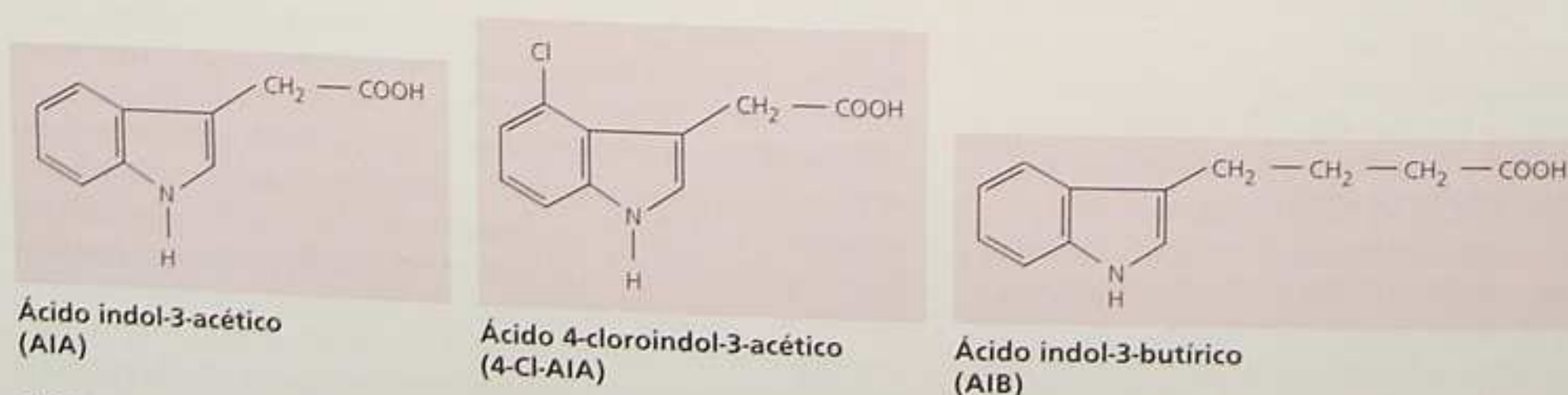



FIGURA 19.3 Estrutura de três auxinas naturais. O ácido indol-3-acético (AIA) ocorre em todos os vegetais, mas outros compostos relacionados apresentam atividade auxínica. Mostarda e milho contêm ácido indol-3-butírico (AIB).

Ácido 2,4-diclorofeno-xiacético (2,4-D)

Ácido 2-metóxi-3,6-diclorobenzóico (dicamba)

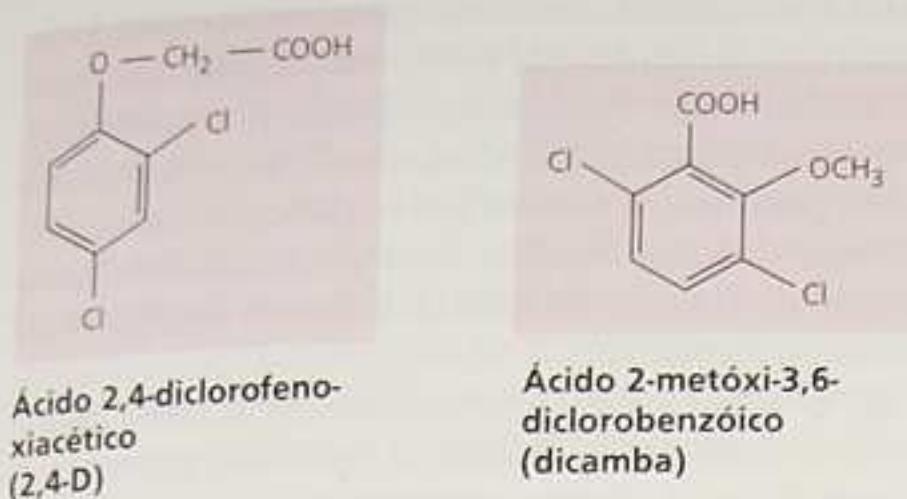



FIGURA 19.4 Estruturas de duas auxinas sintéticas. A maioria das auxinas sintéticas é utilizada como herbicida na horticultura e na agricultura.

dos para a quantificação e identificação precisas de um composto específico.

A espectrometria de massas é o método mais adequado quando são necessárias informações sobre a estrutura química e a quantidade de AIA. O método é usado juntamente com protocolos de separação, envolvendo cromatografia gasosa, e permite tanto a quantificação quanto a identificação precisas de auxinas, podendo detectar até 10^{-12} g (1 picograma, ou pg) de AIA, o que está dentro da variação de auxina encontrada em um segmento de caule de ervilha ou um grão de milho. Tais técnicas sofisticadas têm permitido aos pesquisadores analisar cm precisão os precursores de auxinas, a reciclagem e a distribuição deste hormônio na planta.

O AIA é sintetizado nos meristemas, nas folhas jovens, nos frutos e nas sementes em desenvolvimento

A biossíntese de AIA está associada aos tecidos com rápida divisão celular e crescimento, especialmente nas partes aéreas. Embora quase todos os tecidos vegetais sejam capazes de produzir baixos níveis de AIA, os meristemas apicais, as folhas jovens, os frutos e as sementes em desenvolvimento são os principais locais de síntese deste hormônio (Ljung e cols., no prelo).

Nos primórdios de folhas jovens de *Arabdopsis*, a auxina é sintetizada no ápice. Durante o desenvolvimento foliar ocorre uma inversão basípeta gradual do local de produção de auxina, iniciando ao longo das margens da folha e, mais tarde, para a região central da lâmina. Essa inversão na produção de auxina está relacionada à seqüência basípeta do desenvolvimento foliar e da diferenciação vascular (Aloni, 2001)

A transformação de folhas de *Arabidopsis*, usando *Agrobacterium* que contém o plasmídeo Ti modificado com uma construção formada pela fusão do gene repórter *GUS* (β-glucuronidase) com um promotor contendo um elemento de resposta à auxina, permite visualizar a distribuição da auxina livre em folhas jovens em desenvolvimento. Em qualquer parte que a auxina seja produzida, a expressão do gene GUS ocorre — e pode ser detectada histoquimicamente. Pelo uso dessa técnica, foi há pouco demonstrado que a auxina é produzida por um conjunto de células localizadas nas regiões onde se desenvolverão os hidatódios (Figura 19.5).

Os **hidatódios** são modificações semelhantes a glândulas dos tecidos fundamental e vascular, tipicamente na margem das folhas, os quais permitem a liberação de água na forma líquida (fluido da gutação) através dos poros na epiderme, na presença de pressão de raiz (ver Capítulo 4). Conforme ilustrado na Figura 19.5, durante os estágios iniciais da diferenciação dos hidatódios, um centro de intensa síntese de auxina fica evidente como uma mancha azul escuro, decorrente da atividade de GUS (seta) nos lobos das folhas serrilhadas de *Arabidopsis* (Aloni e cols., 2002). Uma faixa difusa de atividade de GUS forma-se em direção aos elementos de vaso em diferenciação no feixe vascular. Esta notável micrografia representa a diferenciação vascular regulada pela auxina no momento em que o processo está ocorrendo.

O tópico de controle da diferenciação vascular será retomado mais adiante neste capítulo.

Existem múltiplas rotas para a biossíntese do AIA

O AIA é estruturalmente relacionado ao aminoácido triptofano, tendo os estudos iniciais sobre a biossíntese de auxina indicado esse aminoácido como provável precursor. No entanto, foi difícil demonstrar a incorporação de triptofano exógeno marcado (p. ex., [H^3] triptofano) no AIA em tecidos vegetais. Mesmo assim, muitas evidências têm demonstrado que os vegetais convertem triptofano em AIA através de várias rotas, as quais estão descritas a seguir.

FIGURA 19.5 Detecção dos locais de síntese e de transporte de auxina em um primórdio foliar de *Arabidopsis DR5*, através da expressão do gene-repórter *GUS* fusionado com um promotor sensível à auxina. Durante os estádios iniciais da diferenciação dos hidatódios, um centro de síntese da auxina é evidenciado como uma mancha concentrada, azul escuro (seta) nos lobos da margem foliar serrilhada. Um gradiente de atividade difusa de GUS estende-se da margem em direção ao feixe vascular em diferenciação (ponta da flecha), que funciona como um dreno para o fluxo de auxina originado no lobo (cedida por R. Aloni e C.I. Ullrich).

A rota AIP. A rota do **ácido indol 3-pirúvico (AIP)** (ver Figura 19.6C) é provavelmente a mais comum das vias dependentes do triptofano. Ela envolve uma reação de desaminação para formar AIP, seguido por uma reação de descaboxilação para formar o indol-3-acetaldeído (IAld), o qual é, então, oxidado a AIA por uma desidrogenase específica.

A rota TAM. A rota da **triptamina (TAM)** (ver Figura 19.6D) é semelhante à do AIP, exceto pela ordem inversa das reações de desaminação e descarboxilação e pelas diferentes enzimas que estão envolvidas. As espécies que não utilizam a rota do AIP apresentam a TAM. Em pelo menos um caso (tomateiro), há evidência da presença de ambas as rotas (Nonhebel e cols., 1993).

A rota IAN. Na rota do **indol-3-acetonitrila (IAN)** (ver Figura 19.6B), o triptofano é primeiro convertido a indol-3-acetaldoxima e, então, a indol-3-acetonitrila. A enzima que converte IAN a AIA é denominada *nitrilase*. A rota do IAN parece ser importante em apenas três famílias botânicas: Brassicaceae (família das mostardas), Poaceae (família das gramíneas) e Musaceae (família da bananeira). No entanto, genes ou atividades tipo nitrilase têm sido recentemente identificados nas famílias Cucurbitaceae (família da abóbora), Solanaceae (família do tabaco), Fabaceae (leguminosas) e Rosaceae (família da roseira).

Quatro genes (*NIT1* a *NIT4*) que codificam enzimas nitrilase foram clonados de *Arabidopsis*. Quando o gene *NIT2* foi expresso em tabaco transgênico, as plantas resultantes apresentaram a capacidade de responder ao IAN como uma auxina, devido à sua hidrólise a AIA (Schmidt e cols., 1996).

Outra via metabólica dependente de triptofano — a que emprega **indol-3-acetamida (IAM)** como intermediário (ver Figura 19.6A) — é usada por várias bactérias patogênicas, tais como *Pseu-*

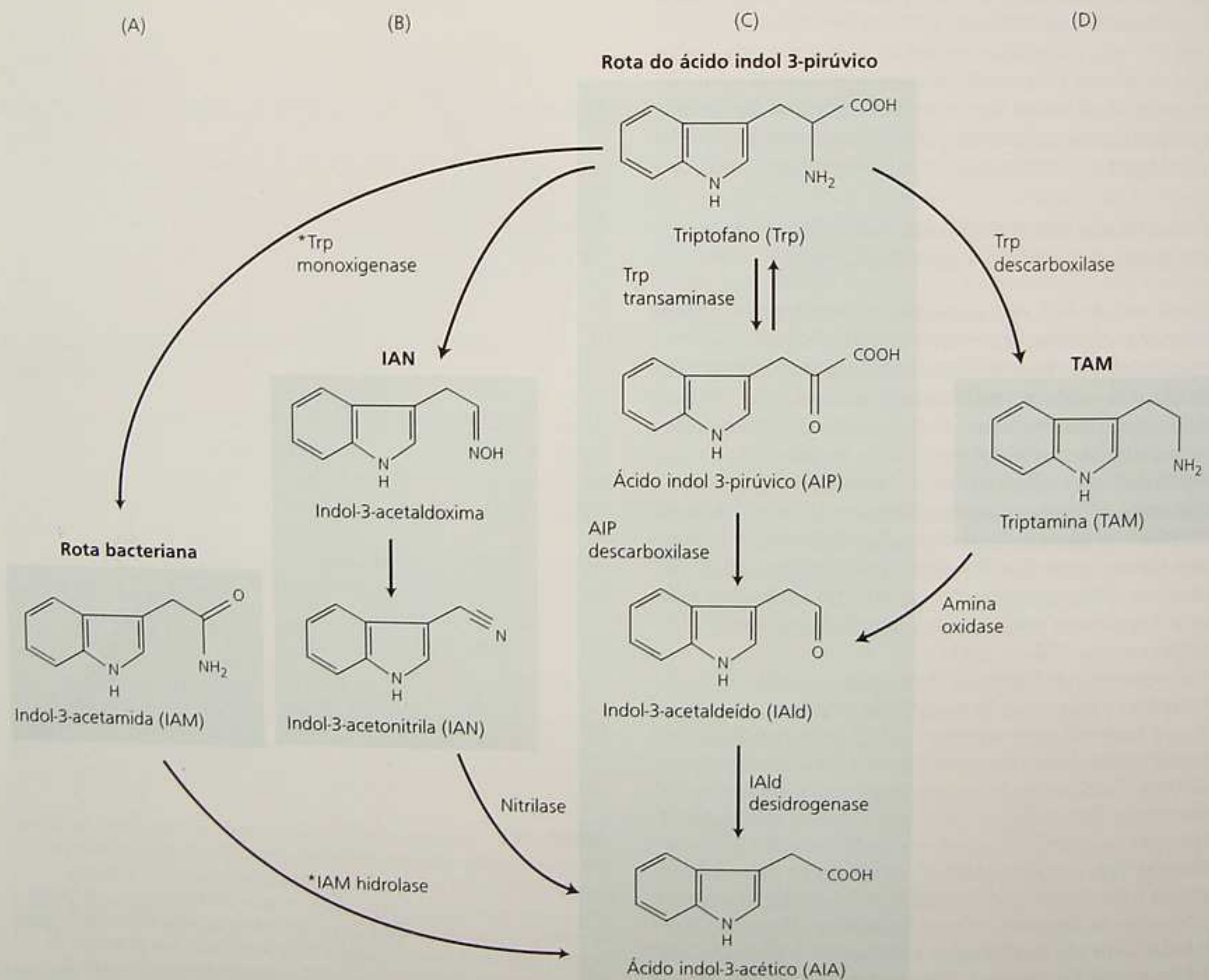



FIGURA 19.6 Rotas de biossíntese de AIA dependentes do triptofano em vegetais e bactérias. As enzimas que estão presentes somente em bactérias estão marcadas com um asterisco (Bartel, 1997).

domonas savastanoi e *Agrobacterium tumefaciens*. Essa rota envolve as enzimas triptofano monoxigenase e IAM hidrolase. As auxinas produzidas por essas bactérias freqüentemente estimulam mudanças morfológicas nas respectivas plantas hospedeiras.

Além das rotas dependentes do triptofano, estudos genéticos recentes têm fornecido evidências de que os vegetais podem sintetizar AIA por meio de uma ou mais rotas independentes deste aminoácido. Com a existência de vias alternativas de biossíntese do AIA, é praticamente impossível que falte auxina nas plantas, sendo provavelmente um reflexo do papel essencial desse hormônio no desenvolvimento vegetal.

O AIA também é sintetizado a partir do indol ou a partir do indol-3-glicerol fosfato

Embora haja suspeita da existência de uma via independente do triptofano para a biossíntese de AIA devido aos baixos níveis de conversão do triptofano marcado radioativamente em AIA, nenhuma das abordagens genéticas disponíveis pôde confirmar e definir a existência de tais rotas metabólicas. Talvez o mais notável dessa pesquisa envolve o mutante *pericarpo laranja (orp)* de milho (Figura 19.7), no qual ambas as subunidades da enzima triptofano sintase são inativas (Figura 19.8). O mutante *orp* é um legítimo triptofano-auxotrófico, requerendo triptofano exógeno para sobreviver. Contudo, nem as plântulas *orp* nem as plântulas selvagens podem converter triptofano em AIA, mesmo quando é fornecido às plântulas mutantes triptofano em quantidade suficiente para reverter os efeitos letais da mutação.

Apesar do bloqueio na biossíntese de triptofano, o mutante *orp* apresenta quantidades de AIA 50 vezes maiores que a planta selvagem (Wright e cols., 1991). Quando as plântulas *orp* são supridas com [^{15}N] antranilato (ver Figura 19.8), o N marcado aparece posteriormente no AIA, mas não no triptofano. Tais resultados fornecem a melhor evidência experimental para a existência de uma rota de biossíntese de AIA independente do triptofano.

Os estudos posteriores estabeleceram que o ponto de ramificação para a biossíntese de AIA é o indol ou seu precursor, o indol-3-glicerol fosfato, mas o precursor imediato do AIA na rota independente do triptofano ainda não foi identificado.

FIGURA 19.7 No mutante pericarpo laranja (*orp*) de milho as duas subunidades da enzima triptofano sintase não estão presentes. Como resultado, os pericarpos adjacentes a cada grão acumulam glicosídeos do ácido antranílico e indólico. A cor laranja decorre do excesso de indol (cedida por Jerry D. Cohen).

A descoberta da rota independente do triptofano alterou drasticamente a compreensão da biossíntese de AIA, porém a importância relativa das duas rotas (dependente e independente do triptofano) é pouco compreendida. Em várias espécies foi descoberto que o tipo de rota biossintética de AIA varia entre diferentes tecidos e entre as fases do desenvolvimento. Por exemplo, durante a embriogênese de cenoura, a via dependente do triptofano é importante no início do desenvolvimento, enquanto que a sua via independente é ativada logo após o estabelecimento do eixo raiz-parte aérea (para outras evidências sobre a biossíntese de AIA dependente do triptofano, ver **Tópico 19.4 na Internet**).

A maior parte do AIA na planta está na forma covalentemente ligada

Embora o AIA livre seja a forma biologicamente ativa do hormônio, a grande maioria da auxina dos vegetais é encontrada no estado covalentemente ligado. Essas auxinas conjugadas, ou "ligadas", foram identificadas em todos os vegetais superiores e são consideradas hormônios inativos.

O AIA tem sido encontrado conjugado a compostos de alto e baixo pesos moleculares.

- Auxinas conjugadas à moléculas de baixo peso molecular incluem ésteres de AIA com glicose ou *mio*-inositol, além de conjugados de amidas, tais como AIA-*N*-aspartato (Figura 19.9).
- Auxinas conjugadas à moléculas de alto peso molecular incluem AIA-glucano* (7 a 50 unidades de glicose por AIA) e AIA-glicoproteínas encontradas em cereais.

O composto ao qual a auxina está conjugada e a extensão da conjugação depende de enzimas específicas. A reação mais estudada é a conjugação do AIA à glicose em *Zea mays*.

As concentrações mais altas de auxina livre nos vegetais são encontradas nos meristemas apicais da parte aérea e nas folhas jovens, pois eles são os principais locais de biossíntese deste hormônio. No entanto, as auxinas estão amplamente distribuídas na planta. O metabolismo da auxina conjugada pode ser o principal fator contributivo para a regulação dos níveis de auxina livre. Por exemplo, durante a germinação de sementes de *Zea mays*, o AIA-*mio*-inositol é translocado do endosperma para o coleóptilo, por intermédio do floema. Pelo menos uma parte do AIA livre no ápice do coleóptilo de *Zea mays* parece ser derivada da hidrólise do AIA-*mio*-inositol.

Além disso, foi demonstrado que estímulos ambientais, como a luz e a gravidade, afetam tanto a taxa de conjugação de auxina (remoção da auxina livre) quanto a de liberação de auxina livre (hidrólise da auxina conjugada). A formação de auxina conjugada pode ter outras funções, incluindo reserva ou proteção contra a degradação oxidativa.

O AIA é degradado por múltiplas rotas

Assim como a biossíntese, a quebra enzimática (oxidação) do AIA pode envolver mais de uma rota metabólica. Por algum tem-

*N. de T. Os glucanos são polímeros compostos somente por unidades de glicose (do inglês, *glucose*).

ROTA BIOSSINTÉTICA DO TRIPTOFANO

Corismato
Antranilato sintase
Antranilato
Antranilato PR-transferase
5-Fosforibosilantranilato
PR-antranilato isomerase
1-(o-Carboxifenilamino)-1-deoxiribulose 5-P
IGP sintase
Inibição por *feedback*

ROTA DE SÍNTESE DO AIA INDEPENDENTE DO TRIPTOFANO

Indol-3-glicerol fosfato (IGP)
Trp sintase α (*trp3*)
Serina + Indol
Trp sintase β (*trp2, orp*)
Trp
Indol-3-acetonitrila (IAN)
Nitrilase (*nit1*)
Indol-3-ácido pirúvico (AIP)
Triptofano aminotransferase (hipotética)
AIA

FIGURA 19.8 As rotas de biossíntese de AIA independentes do triptofano em plantas. A via biossintética do triptofano (Trp) está representada à esquerda. Os mutantes discutidos no **Tópico 19.4 na Internet** estão indicados nos parênteses. O ponto precursor de ramificação da biossíntese independente do triptofano é duvidoso (indol-3-glicerol fosfato ou indol), e o IAN e o AIP são dois intermediários possíveis. PR, fosforibosil (Bartel, 1997).

po acreditou-se que enzimas peroxidades eram as principais responsáveis pela oxidação do AIA, sobretudo porque elas são ubíquas nas plantas superiores e sua capacidade em degradar AIA pode ser demonstrada *in vitro* (Figura 19.10A). Entretanto, o significado fisiológico da via peroxidase é duvidoso. Por exemplo, não foram observadas alterações nos níveis de AIA em plantas transgênicas com a expressão de peroxidase aumentada em 10 vezes ou com a atividade peroxidade reduzida em 10 vezes (Normanly e cols., 1995).

Com base na marcação com isótopos e na identificação metabólica, duas outras rotas de oxidação são mais prováveis de estar relacionadas com a degradação controlada do AIA (ver Figura 10.10A). O produto final dessa rota é o ácido oxindol-3-acético (OxIAA), um composto que ocorre naturalmente no endosperma e nos tecidos da parte aérea de *Zea mays*. Em uma rota, o AIA é oxidado a OxIAA sem descarboxilação. Em outra rota, o AIA-aspartato é primeiro oxidado formando um intermediário dioxindol-3-acetil-aspartato e, então, oxidado a OxIAA.

O AIA pode ser oxidado *in vitro*, sem a participação de enzimas, quando exposto à alta intensidade luminosa, podendo essa fotodestruição ser promovida por pigmentos vegetais como a riboflavina. Embora os produtos da fotoxidação da auxina tenham sido isolados dos vegetais, a função da via de fotoxidação *in vivo*, se houver, é possivelmente menos importante.

Existem dois *pools* subcelulares de AIA: o citosol e os cloroplastos

A distribuição do AIA na célula parece ser regulada basicamente pelo pH. Visto que o AIA^- não se difunde rapidamente pelas membranas, a auxina tende a se acumular em compartimentos da célula que sejam mais alcalinos.

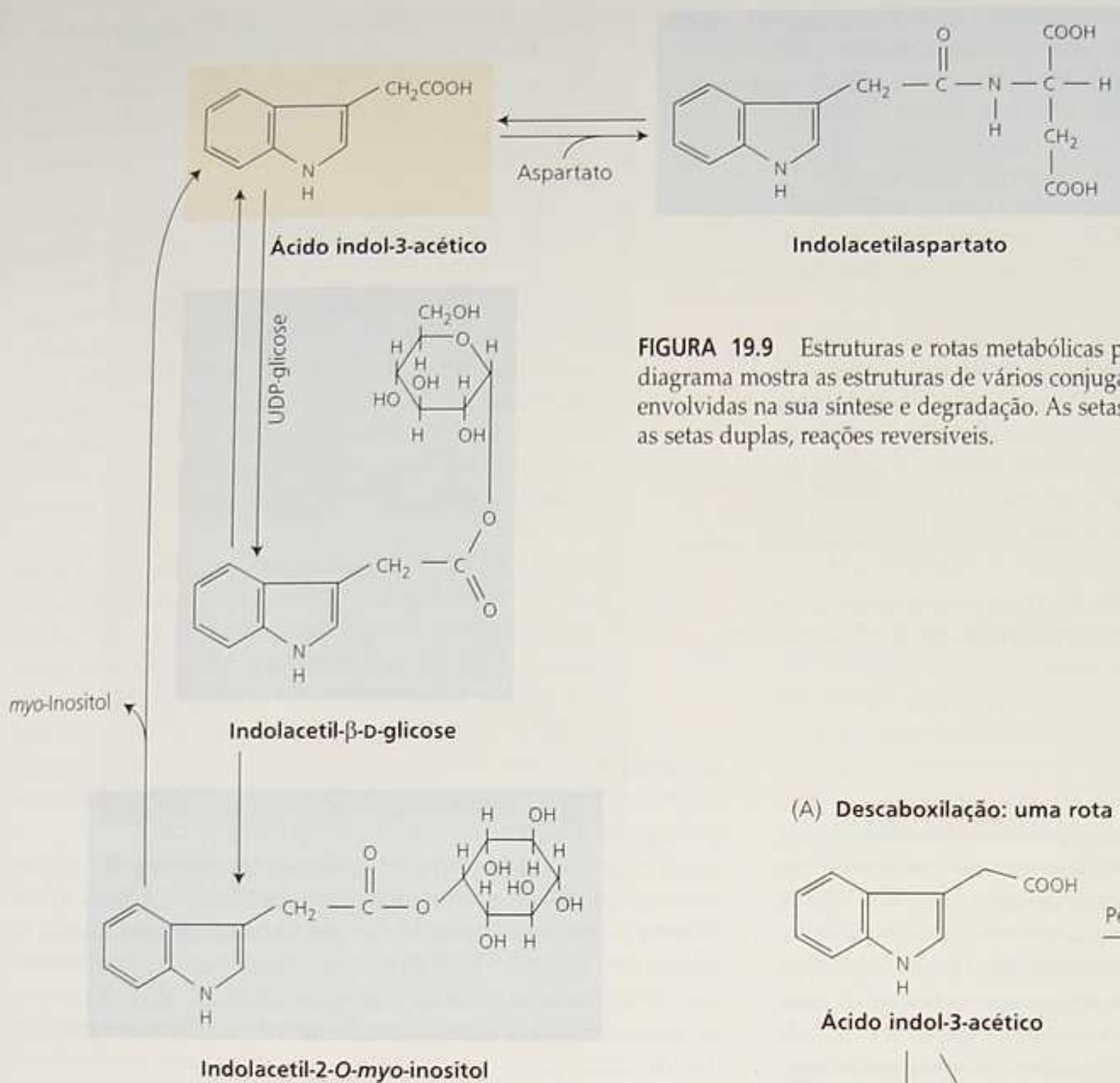



FIGURA 19.9 Estruturas e rotas metabólicas propostas para auxinas conjugadas. O diagrama mostra as estruturas de vários conjugados de AIA e as rotas metabólicas envolvidas na sua síntese e degradação. As setas simples indicam rotas irreversíveis; as setas duplas, reações reversíveis.

A distribuição de AIA e seus metabólitos tem sido bem estudadas em células de tabaco. Cerca de um terço do AIA é encontrado no cloroplasto, enquanto o restante está localizado no citoplasma. Os conjugados de AIA estão presentes exclusivamente no citosol. O AIA do citosol é metabolizado por conjugação ou por catabolismo descarboxilativo (ver Figura 19.10). O AIA dos cloroplastos está protegido desses processos, mas é regulado pela quantidade de AIA do citosol, com o qual ele está em equilíbrio (Sitbon e cols., 1993).

Os fatores que regulam a concentração estável da auxina livre nas células vegetais estão esquematicamente resumidos no **Tópico 19.5 na Internet.**

FIGURA 19.10 Biodegradação de AIA. (A) A rota de peroxidase (via de descarboxilação) exerce um papel relativamente secundário. (B) As duas rotas de oxidação que não envolvem descarboxilação do AIA, A e B, são as vias metabólicas mais comuns.

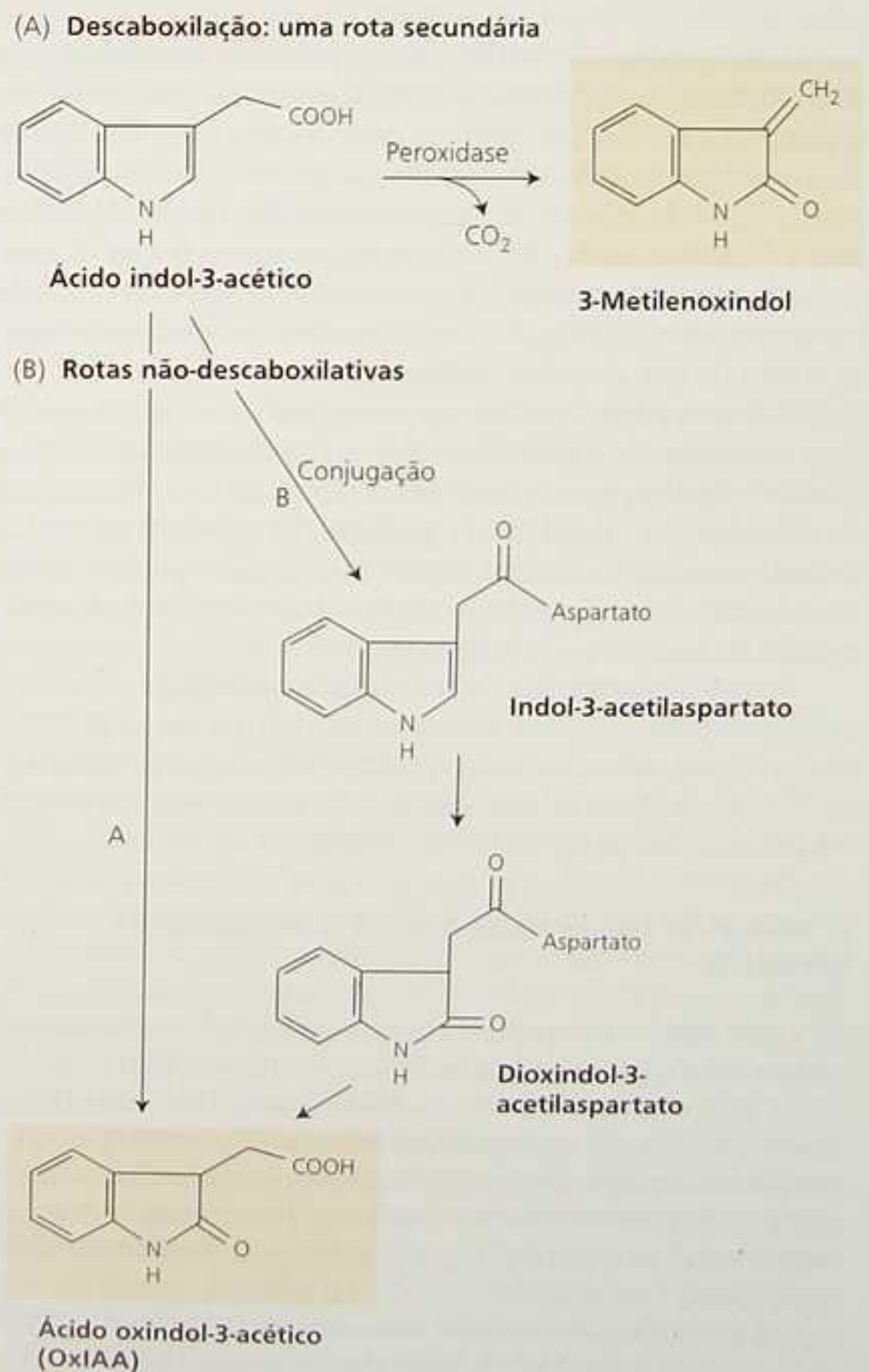
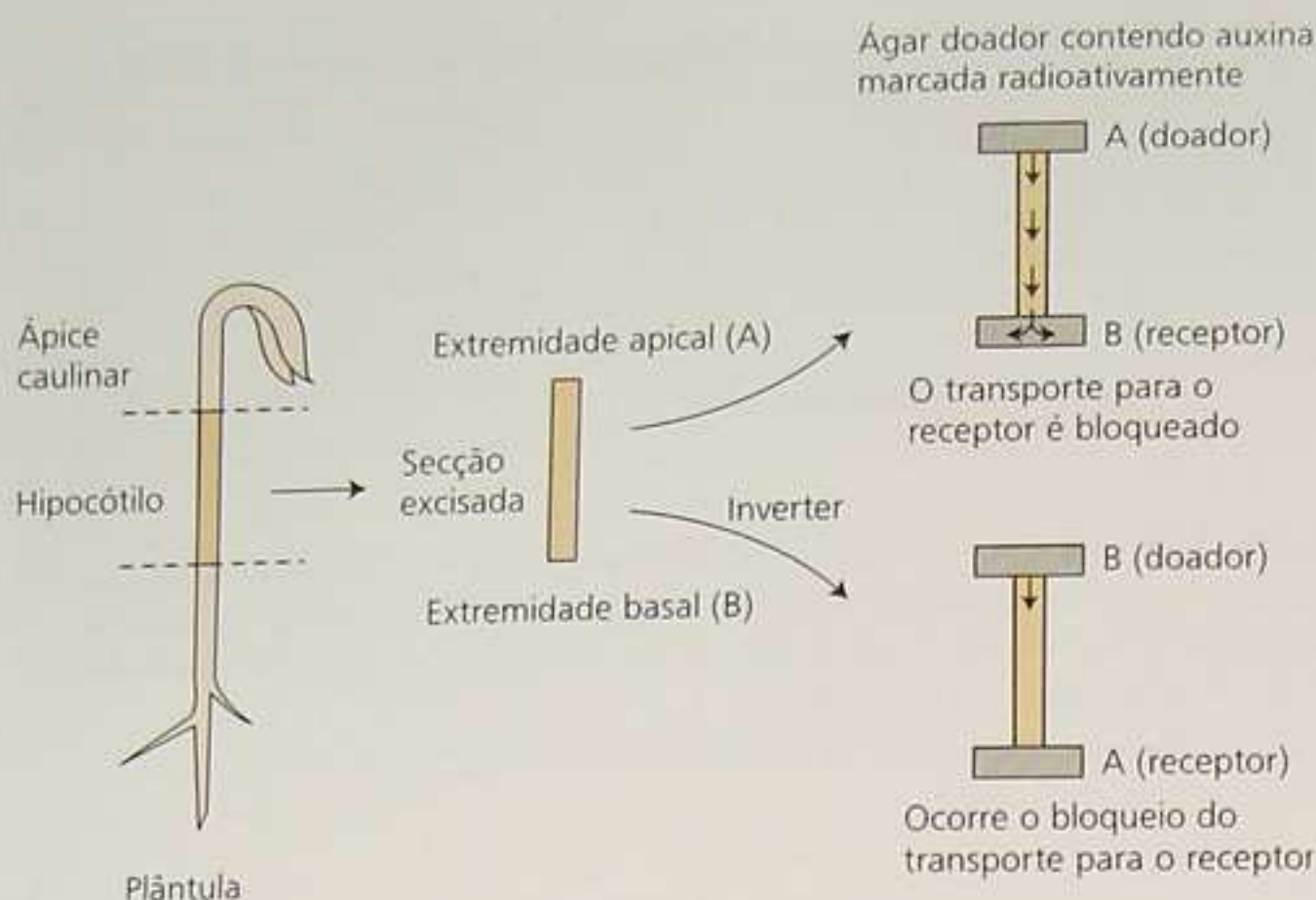



FIGURA 19.11 Método-padrão para medir o transporte polar da auxina. A polaridade do transporte é independente da orientação em relação à gravidade.

O TRANSPORTE DA AUXINA

O eixo principal das partes aéreas e das raízes, juntamente com suas ramificações, exibe uma polaridade estrutural ápice-base, cuja origem está no transporte polar de auxina. Logo após Went haver desenvolvido o teste de curvatura do coleóptilo para auxina, foi descoberto que o AIA movia-se principalmente da extremidade apical para a basal (transporte *basípeto)* nos segmentos excisados de coleóptilo de aveia. Esse tipo de transporte unidirecional é denominado **transporte polar**. A auxina é o único hormônio de crescimento vegetal conhecido que apresenta transporte polar.

Visto que o ápice caulinar age como fonte principal de auxina para toda a planta, o transporte polar tem sido apontado como a causa principal do gradiente de auxina formado do ápice caulinar ao radicular (ver Glossário). O gradiente longitudinal da auxina da parte aérea até a raiz afeta vários processos do desenvolvimento, incluindo o alongamento do caule, a dominância apical, a cicatrização de lesões e a senescência foliar.

Recentemente foi descoberto que uma quantidade significativa do transporte de auxina ocorre no floema e que ele é a principal rota pela qual a auxina é transportada em direção *acrópeta* (ou seja, em direção ao ápice) na raiz. Assim, mais de uma rota é responsável pela distribuição da auxina na planta.

O transporte polar requer energia e independe da gravidade

Para estudar o transporte polar, os pesquisadores têm empregado o *método do bloco de ágar doador-receptor* (Figura 19.11): um bloco de ágar contendo auxina marcada com radioisótopo (bloco doador) é colocado na extremidade de um segmento de tecido e um bloco receptor é disposto na extremidade oposta. O movimento da auxina pelo tecido em direção ao bloco receptor pode ser determinado ao longo do tempo pela medição da radioatividade neste bloco.

A partir de vários estudos como este, as propriedades gerais do transporte polar do AIA foram determinadas. Os tecidos diferem no grau de polaridade do transporte do AIA Em coleóptilos, caules vegetativos e pecíolos predomina o transporte basípeto. O transporte polar não é afetado pela orientação do tecido (pelo menos em períodos curtos de tempo), razão pela qual não é dependente da gravidade.

Uma simples demonstração da ausência de efeito da gravidade no transporte polar está ilustrada na Figura 19.12. Quando estacas (neste caso, de bambu) são colocadas em câmara úmida, raízes adventícias sempre se formam na extremidade basal da estaca, mesmo quando as estacas são invertidas. Visto que a diferenciação das raízes é estimulada pelo aumento da concentração de auxina, esse hormônio deve ser transportado no caule na direção basípeta, mesmo quando a estaca está orientada com a parte superior voltada para baixo.

O transporte polar ocorre mais de célula a célula do que através do simplasto. Assim, a auxina sai da célula através da membrana plasmática, difunde-se pela lamela média composta e entra na célula abaixo via membrana plasmática. A saída de auxina da célula é denominada *efluxo*; a entrada de auxina nas células é chamada de *absorção de auxina* ou *influxo*. O processo total é dependente de energia, conforme evidenciado pela sensibilidade do transporte polar à falta de O_2 e a inibidores metabólicos.

A velocidade do transporte polar da auxina varia de 5 a 20 cm h^{-1} — mais rápido do que a taxa de difusão (ver **Tópico 3.2 na Internet**), porém mais lenta do que as taxas de translocação no floema (ver Capítulo 10). O transporte polar é específico para auxinas ativas, tanto as naturais quanto as sintéticas. Nem os análogos de auxinas inativas nem os metabólitos da auxina são transportados de modo polar, sugerindo que esse transporte envolve transportadores protéicos específicos na membrana plasmática, os quais podem reconhecer o hormônio e seus respectivos análogos.

O principal local de transporte polar basípeto da auxina nos caules e folhas é o parênquima vascular. Os coleóptilos parecem ser exceção, pois neles o transporte polar basípeto ocorre principalmente nos tecidos a vasculares. O transporte polar acrópeto na raiz está especificamente associado ao parênquima do xilema do estelo (Palm e Gälweiler, 1999). No entanto, como será apresentado neste capítulo, a maior parte da auxina que atinge o ápice da raiz é translocada pelo floema.

Um pequeno transporte basípeto da auxina no ápice da raiz também foi demonstrado. Em raízes de milho, por exemplo, o AIA radioativo aplicado à extremidade da raiz foi transportado na direção basípeta por cerca de 2 a 8 mm (Young e Evans, 1996). O transporte basípeto da auxina em raízes ocorre na epiderme e em tecidos corticais, e, como será visto, apresenta um papel central no gravitropismo.

Um modelo quimiosmótico foi proposto para explicar o transporte polar

A descoberta do mecanismo quimiosmótico do transporte de soluto no final da década de 1960 (ver Capítulo 6) levou à aplicação desse modelo ao transporte polar da auxina. De acordo com o **modelo quimiosmótico** atualmente aceito para o transporte polar da auxina, a absorção de auxina é impulsionada pela força-motriz de prótons ($\Delta E + \Delta pH$) via membrana plasmática, enquanto que o

FIGURA 19.12 As raízes crescem a partir da extremidade basal destas estacas de bambu, mesmo quando estão invertidas. As raízes formam-se na extremidade basal porque o transporte polar da auxina nas partes aéreas é independente da gravidade (fotografia © M.B. Wilkins).

efluxo é dirigido pelo potencial de membrana, ΔE (a força-motriz de prótons está descrita em mais detalhes no **Tópico 6.3 na Internet** e no Capítulo 7).

Um aspecto crucial do modelo de transporte polar consiste em que os transportadores para o efluxo da auxina estejam localizados nas extremidades basais das células condutoras (Figura 19.13). A evidência para cada etapa do modelo é considerada separadamente na discussão a seguir.

Influxo de auxina. A primeira etapa do transporte polar é o influxo de auxina. De acordo com o modelo, a auxina pode entrar nas células vegetais de qualquer direção através de um dos dois mecanismos seguintes:

1. Difusão passiva da forma protonada (AIAH) pela bicamada lipídica.
2. Transporte secundário ativo da forma dissociada (AIA^-) por um simporte $2H^+$-AIA^-.

As duas vias de absorção da auxina ocorrem porque a permeabilidade passiva da membrana à auxina depende fortemente do pH apoplástico.

A forma não-dissociada do ácido indol-3-acético, no qual o grupo carboxílico é protonado, é lipofílica e difundida rapidamente através da bicamada lipídica da membrana. Por outro lado, a forma dissociada da auxina é negativamente carregada e, portanto, não atravessa a membrana sem auxílio. Visto que a H^+-ATPase da membrana normalmente mantém a solução da parede celular em pH em torno de 5, cerca da metade da auxina (pK_a= 4,75) no apoplasto estará na forma não-dissociada e se difundirá passivamente pela membrana, a favor de um gradiente de concentração. Evidências experimentais para a absorção passiva da auxina, pH-dependente, foram de início fornecidas pela demonstração de que a absorção de AIA pelas células vegetais aumenta quando o pH extracelular passa de um valor neutro para um valor mais ácido.

Um mecanismo secundário de absorção ativa, mediado por transportador, demonstrou ser saturável e específico para auxinas ativas (Lomax, 1986). Em experimentos nos quais os valores de ΔpH e ΔE de membranas de vesículas isoladas de hipocótilos de abobrinha (*Cucurbita pepo*) foram manipulados artificialmente, a absorção de auxina radioativa é estimulada na presença de um gradiente de pH, como na absorção passiva, mas também quando o interior da vesícula estava negativamente carregado em relação ao meio externo.

Estes e outros experimentos sugerem que um transportador H^+-AIA^- do tipo simporte co-transporta dois prótons junto à auxina aniônica. Este transporte secundário ativo da auxina permite um maior acúmulo de auxina do que a simples difusão, pois é movido através da membrana pela força-motriz de prótons.

Um transportador de absorção da auxina do tipo permease, AUX1, relacionado aos transportadores bacterianos de aminoácidos, foi identificado em raízes de *Arabdopsis* (Bennett e cols., 1996). As raízes de mutantes *aux1* são agravitrópicas, sugerindo que o influxo de auxina constitui-se um fator limitante para o gravitropismo em raízes. Como previsto no modelo quimiosmótico, o AUX1 parece estar uniformemente distribuído em torno das células na rota do transporte polar (Marchant e cols., 1999). Assim, a polaridade do transporte da auxina é geralmente governada mais pelo efluxo do que pelo influxo.

Efluxo de auxina. Uma vez que o AIA esteja no citosol, onde o pH é de aproximadamente 7,2, quase todo o AIA dissocia-se na forma aniônica. Visto que a membrana é menos permeável ao AIA^- do que ao AIAH, o AIA^- tenderá a se acumular no citosol. No entanto, a maior parte da auxina que entra na célula sai através de um *transportador de efluxo da auxina aniônica*. De acordo com o modelo quimiosmótico, o transporte de AIA^- para fora da célula é acionado pelo potencial negativo da membrana.

Conforme já mencionado, a característica central do modelo quimiosmótico para o transporte polar é que o efluxo do AIA^- ocorre preferencialmente na extremidade basal de cada célula. A absorção continuada da auxina pela extremidade apical da célula e a liberação preferencial pela base origina o efeito do transporte polar. Uma família de transportadores putativos para efluxo de auxina conhecidos como **proteínas PIN** (nome dado segundo a forma de grampo das inflorescências formadas em mutantes *pin1* de *Arabidopsis*; Figura 19.14A) estão localizados precisamente como supõe o modelo — ou seja, na extremidade basal das células condutoras (ver Figura 19.14B).

As proteínas PIN apresentam 10 a 12 regiões transmembrana, características da principal superfamília de transportadores de bactérias e eucariontes, a qual inclui proteínas de resistência a drogas e transportadores de açúcares (Figura 19.15). Apesar das semelhanças topológicas a outros transportadores, estudos recentes sugerem que a PIN pode necessitar de outras proteínas para ser ativa e pode integrar um complexo protéico maior.

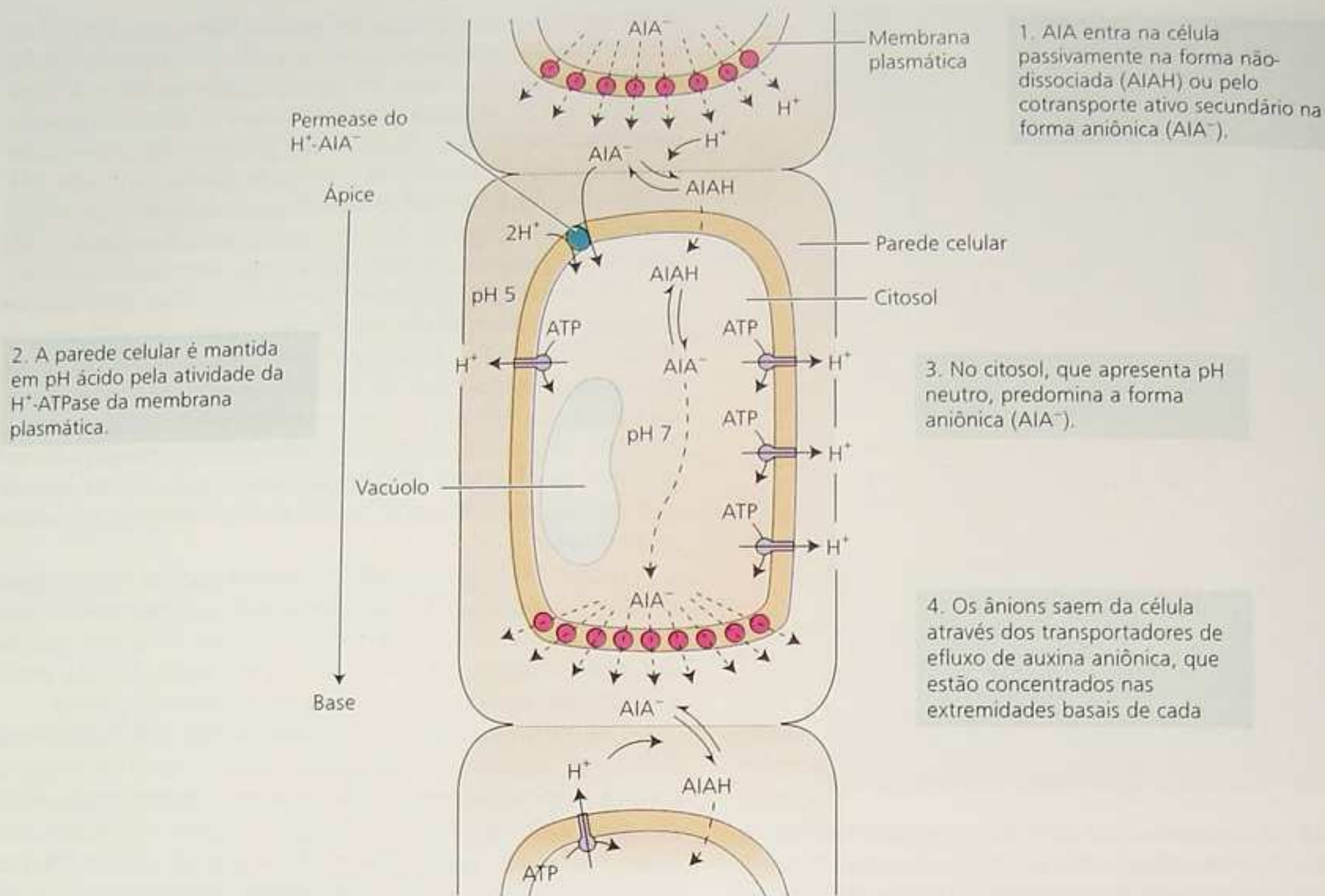



FIGURA 19.13 Modelo quimiosmótico para o transporte polar da auxina. Aqui é ilustrada uma célula de uma coluna de células transportadoras de auxina (Jacobs e Gilbert, 1983).

1. AIA entra na célula passivamente na forma não-dissociada (AIAH) ou pelo cotransporte ativo secundário na forma aniônica (AIA^-).

2. A parede celular é mantida em pH ácido pela atividade da H^+-ATPase da membrana plasmática.

3. No citosol, que apresenta pH neutro, predomina a forma aniônica (AIA^-).

4. Os ânions saem da célula através dos transportadores de efluxo de auxina aniônica, que estão concentrados nas extremidades basais de cada

Os inibidores do transporte de auxina bloqueiam o seu efluxo

Vários compostos sintéticos podem agir como **inibidores do transporte de auxina (ITA)**, incluindo NPA (ácido 1-*N*-naftilftalâmico) e TIBA (ácido 2,3,5-triiodobenzóico) (Figura 19.16). Tais inibidores bloqueiam o transporte polar por impedir o efluxo da auxina. Esse fenômeno pode ser demonstrado incorporando NPA ou TIBA no bloco doador ou no receptor em um experimento de transporte de auxina. Ambos os compostos inibem o efluxo de auxina para o bloco receptor, mas não afetam sua absorção a partir do bloco doador.

Alguns ITAs, como TIBA, que apresentam fraca atividade auxínica e são transportados de maneira polar, podem inibir o transporte polar, em parte, por competir com a auxina pelo seu sítio de ligação no transportador de efluxo. Outros, como o NPA, não são transportados de modo polar e parecem interferir no transporte da auxina por se ligarem a proteínas associadas, formando um complexo com o transportador de efluxo. Tais proteínas ligantes de NPA são também encontradas nas extremidades basais das células condutoras, consistente com a localização das proteínas PIN (Jacobs e Gilbert, 1983).

(A) (B)

FIGURA 19.14 O mutante *pin1* de *Arabidopsis* (A) e a localização da proteína PIN1 nas extremidades basais das células condutoras por microscopia de imunofluorescência (B) (cedida por L. Gälweiler e K. Palmer).

EXTRACELULAR
Membrana plasmática
I II III IV V VI VII VIII XI X
NH_2
COOH
CITOPLASMA

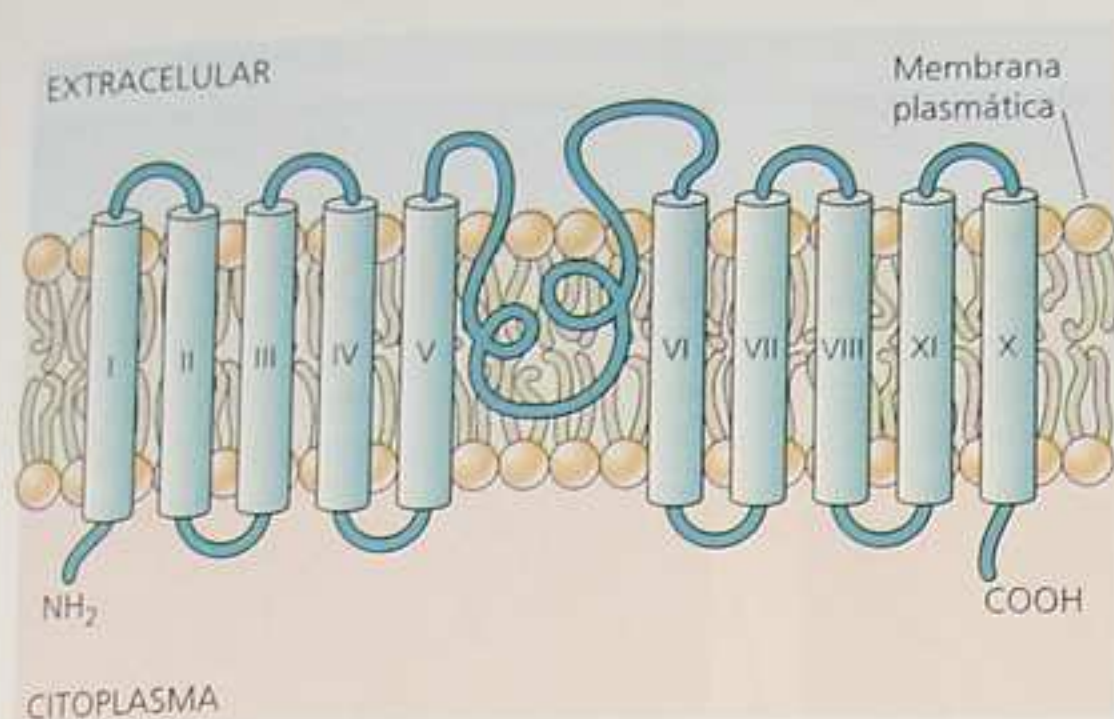



FIGURA 19.15 A topologia da proteína PIN1 com 10 regiões transmembrana e uma grande alça hidrofílica no meio (Palmer e Gälweiler, 1999).

Recentemente, foi identificada uma classe de ITAs que inibe o transportador de absorção AUX1 (Parry e cols., 2001). Por exemplo, o ácido 1-naftoxiacético (1-NOA) (ver Figura 19.6) bloqueia a absorção celular de auxina e, quando aplicado em plantas de *Arabidopsis*, causa o agravitropismo de raiz semelhante àquele observado no mutante *aux1*. Como na mutação *aux1*, nem o 1-NOA ou qualquer outro inibidor AUX1-específico bloqueia o transporte polar da auxina.

As proteínas PIN são ciclicamente incorporadas e removidas da membrana plasmática

A localização basal dos transportadores de efluxo de auxina requer o direcionamento de vesículas de secreção para as extremidades basais das células condutoras. Recentemente, foi demonstrado que as proteínas PIN, embora estáveis, não permanecem em definitivo na membrana plasmática, mas são rapidamente dirigidas a um compartimento endossomal não-identificado, por meio de vesículas endocíticas e, então, recicladas de volta para a membrana (Geldner e cols., 2001).

Antes do tratamento, a proteína PIN1 está localizada nas extremidades basais (topo) das células do parênquima cortical da raiz (Figura 19.17A). O tratamento das plântulas de *Arabdopsis* com brefeldina A (BFA), que leva à agregação das vesículas de Golgi e de outros compartimentos endossomais próximo ao núcleo, faz com que as proteínas PIN acumulem-se nesses compartimentos intracelulares anormais (ver Figura 19.17B). Quando a BFA é retirada pela lavagem com tampão, ocorre o restabelecimento da localização normal das proteínas na membrana plasmática da base das células (ver Figura 19.17C). Por outro lado, quando a citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, é incluída no tampão de lavagem, ocorre a inibição da localização normal da PIN na membrana (ver Figura 19.17D). Tais resultados indicam que a PIN é rápida e ciclicamente transferida da membrana plasmática basal da célula a compartimentos endossomais não-identificados, por meio de um mecanismo dependente da actina.

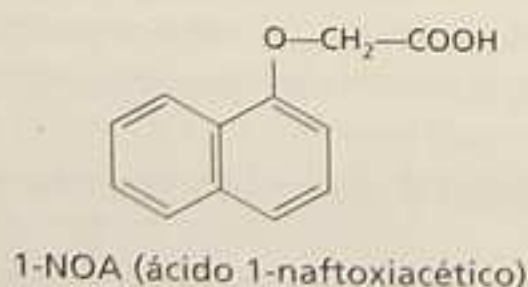
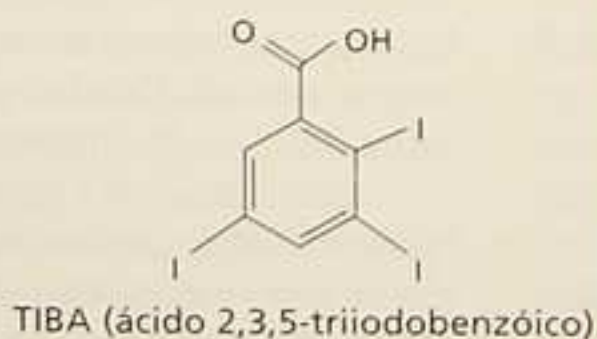
Embora o TIBA e o NPA liguem-se a diferentes alvos, ambos interferem no movimento das vesículas em relação à membrana plasmática. A melhor maneira de demonstrar esse fenômeno é incluir TIBA na solução de lavagem após o tratamento com BFA. Sob tais condições, o TIBA inibe a localização normal da PIN na membrana plasmática após a lavagem (ver Figura 19.17E) (Geldner e cols., 2001).

Os efeitos do TIBA e do NPA no movimento cíclico das vesículas não são específicos para proteínas PIN e foi proposto que os ITAs podem realmente ser inibidores gerais do movimento cíclico de membranas (Geldner e cols., 2001). Por outro lado, nem o TIBA ou o NPA sozinhos causam a localização errônea da PIN, embora eles bloqueiem o efluxo da auxina. Assim, tanto o TIBA quanto o NPA devem, igualmente, ter capacidade de inibir a atividade de

Inibidores do transporte de auxina não encontrados em vegetais

NPA (ácido 1-N-naftilftalâmico)

TIBA (ácido 2,3,5-triiodobenzóico)

1-NOA (ácido 1-naftoxiacético)

Inibidores do transporte de auxina que ocorrem naturalmente

Quercitina (flavonol)

Genisteína

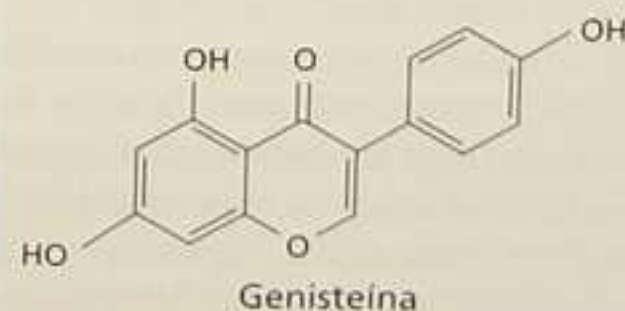
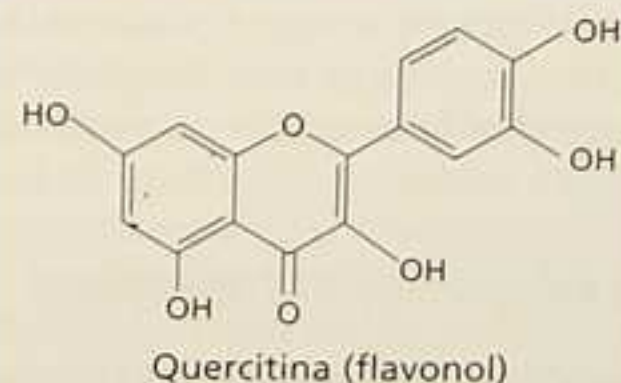



FIGURA 19.16 Estrutura dos inibidores do transporte de auxina

(A) (B) (C) (D) (E)

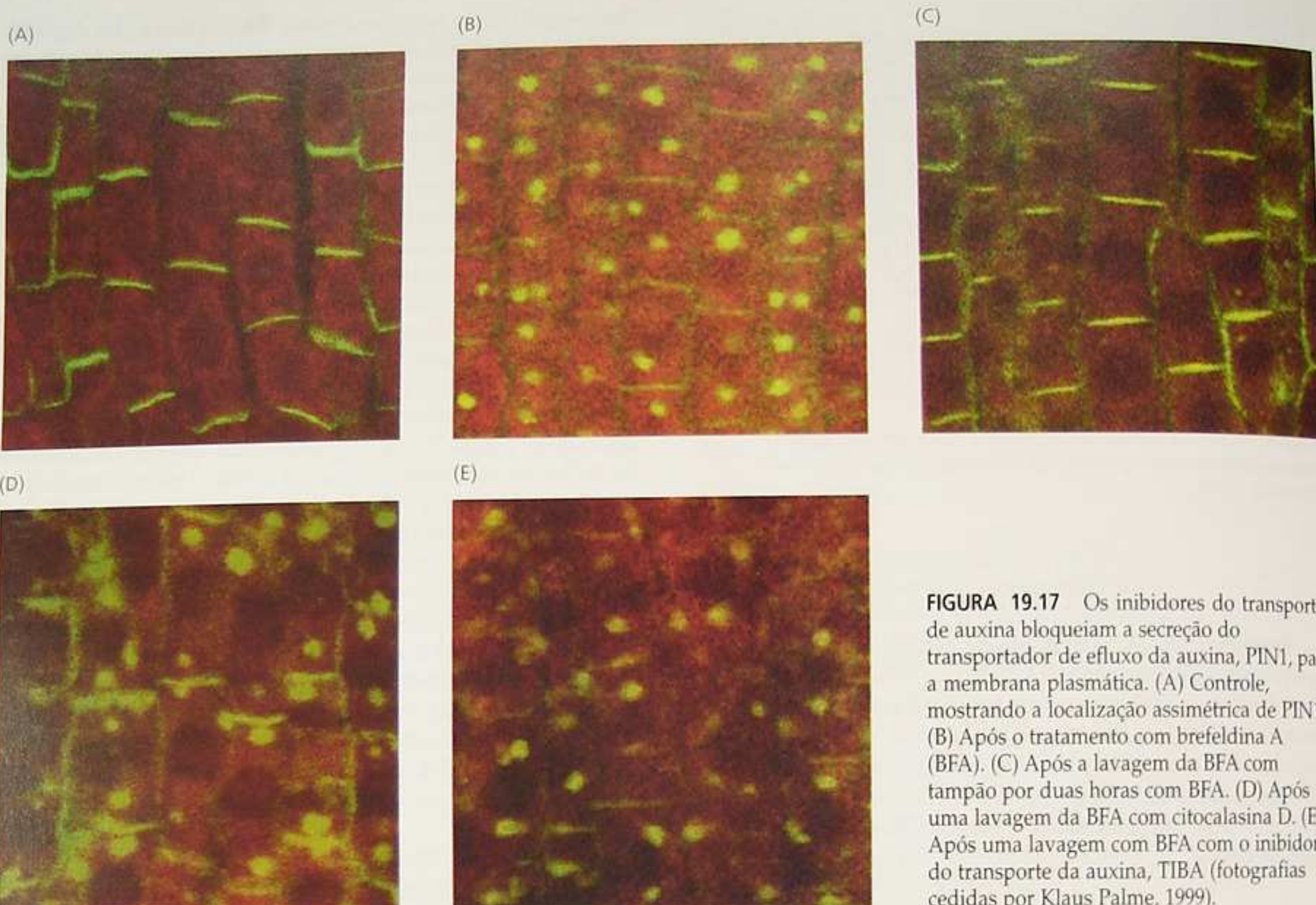



FIGURA 19.17 Os inibidores do transporte de auxina bloqueiam a secreção do transportador de efluxo da auxina, PIN1, para a membrana plasmática. (A) Controle, mostrando a localização assimétrica de PIN1. (B) Após o tratamento com brefeldina A (BFA). (C) Após a lavagem da BFA com tampão por duas horas com BFA. (D) Após uma lavagem da BFA com citocalasina D. (E) Após uma lavagem com BFA com o inibidor do transporte da auxina, TIBA (fotografias cedidas por Klaus Palme, 1999).

transporte dos complexos PIN na membrana plasmática — por se ligar à PIN (como o TIBA) ou a uma ou mais proteínas reguladoras (como o NPA).

Um modelo simplificado dos efeitos do TIBA e do NPA no movimento cíclico da PIN e no efluxo da auxina está demonstrado na Figura 19.18, enquanto outro, mais completo, que incorpora muitas das mais recentes descobertas, encontra-se no **Ensaio 19.2 na Internet**.

Os flavonóides atuam como ITAs endógenos

Há evidências de que os flavonóides (ver Capítulo 13) podem agir como reguladores endógenos do transporte polar da auxina. De fato, os flavonóides agliconas de ocorrência natural (flavonóides sem açúcares ligados) são capazes de competir com o NPA pelo seu sítio de ligação nas membranas (Jacobs e Rubery, 1988) e estão tipicamente localizados na membrana plasmática das extremidades basais das células, onde os transportadores de efluxo estão concentrados (Peer e cols., 2001). Além disso, estudos recentes mostraram que as células deficientes em flavonóides de mutantes de *Arabidopsis* acumulam menos auxina do que as células do tipo selvagem e as plantas mutantes sem flavonóides apresentam um perfil de distribuição de auxina alterado (Murphy e cols., 1999; Brown e cols., 2001).

Muitos dos flavonóides que deslocam o NPA do seu sítio de ligação nas membranas são também inibidores de proteínas quinases e fosfatases (Bernasconi, 1996). Um mutante de *Arabidopsis*, designado *rcn1* (do inglês, *r*oots *c*url in *N*PA *1*) foi identificado com base no aumento da sensibilidade ao NPA. O gene *RCN1* está estreitamente relacionado à subunidade reguladora da proteína fosfatase 2A, uma fosfatase serina/treonina (Gabers e cols., 1996).

As fosfatases são conhecidas pelo importante papel na regulação enzimática, na expressão gênica e na transdução de sinal, por remover os grupos fosfatos reguladores das proteínas (ver **Capítulo 14 na Internet**). A descoberta sugere que a rota de transdução de sinal que envolve as proteínas quinases e fosfatases possa estar relacionada à sinalização entre as proteínas que se ligam ao NPA e os transportadores do efluxo de auxina.

A auxina também é transportada de forma não-polar no floema

A maior parte do AIA sintetizado nas folhas maduras parece ser transportada para o resto da planta de forma não-polar, via

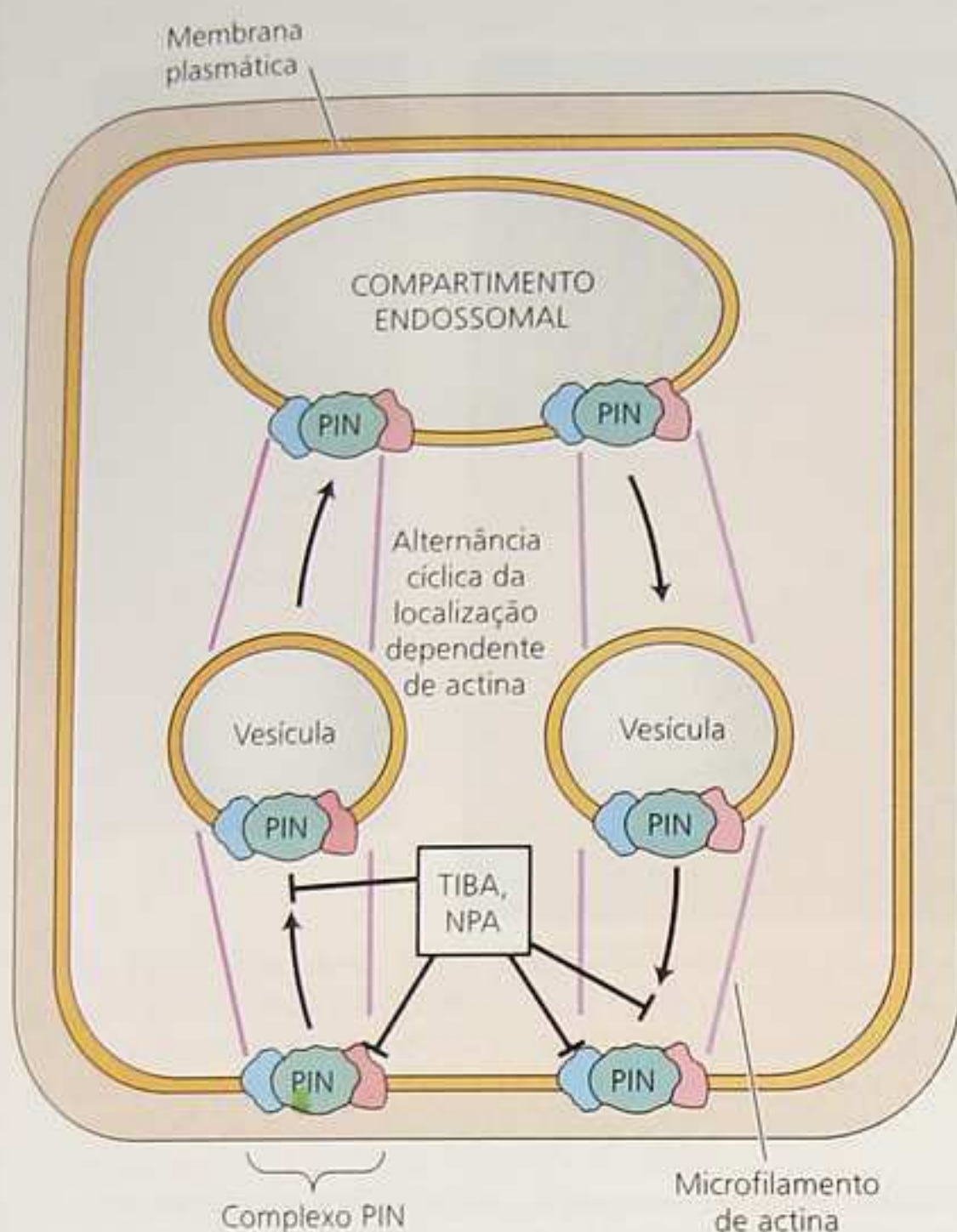



FIGURA 19.18 Alternância cíclica da localização da proteína PIN, dependente da auxina, entre a membrana plasmática e um compartimento endossomal. Os inibidores do transporte da auxina, como TIBA e NPA, interferem na localização das proteínas PIN1 nas regiões basais da membrana plasmática após a lavagem com BFA (ver Figura 19.17), sugerindo que esses inibidores de transporte interferem na localização da PIN1.

floema. A auxina, juntamente com outros componentes da seiva do floema, pode se mover a partir destas folhas em direção ascendente ou descendente, em velocidades muito maiores do que as observadas no transporte polar (ver Capítulo 10). A translocação da auxina no floema é amplamente passiva, não necessitando diretamente de energia.

Embora ainda não esteja determinada a real importância da via do floema *versus* o sistema de transporte polar para o movimento do AIA em longas distâncias, as evidências sugerem que o transporte de auxina de longas distâncias no floema é importante para o controle dos processos de divisão celular do câmbio, no acúmulo de calose ou sua remoção dos elementos de tubo crivado e na ramificação das raízes. De fato, o floema parece representar a principal via para o transporte de longa distância de auxina para as raízes (Aloni, 1995; Swarup e cols., 2001).

Tanto o transporte polar, quanto aquele via floema não são independentes. Estudos recentes com AIA marcado radioativamente sugerem que, em ervilha, a auxina pode ser transferida da via de transporte não-polar para o sistema de transporte polar. Tal transferência ocorre sobretudo nos tecidos imaturos do ápice caulinar.

Um segundo exemplo de transferência de auxina do sistema de transporte não-polar para o polar foi recentemente relatado em *Arabidopsis*, demonstrando que a permease AUX1 está assimetricamente localizada na membrana plasmática da extremidade superior das células do protofloema da raiz (i. é, na extremidade distal ao ápice) (Figura 19.19).

Foi também proposto que a permease AUX1, localizada assimetricamente, promove o movimento acrópeto da auxina do floema para o ápice radicular (Swarup e cols., 2001). Esse tipo de transporte polar da auxina, baseado na localização assimétrica da AUX1, difere do transporte polar que ocorre na parte aérea e na região basal da raiz, o qual está baseado na distribuição assimétrica do complexo PIN.

Observe na Figura 19.19B que a AUX1 é também claramente expressa em um agregado de células na columela da coifa, assim como nas células de revestimento lateral da raiz, que protegem da zona de alongamento distal. Essas células formam uma pequena, mas fisiologicamente importante, via basípeta, por meio da qual a auxina que atinge a columela é redirecionada para os tecidos externos da zona de alongamento. A importância dessa rota será ressaltada quando for examinado o mecanismo de gravitropismo de raiz.

EFEITOS FISIOLÓGICOS DA AUXINA: ALONGAMENTO CELULAR

A auxina foi descoberta como um hormônio envolvido na curvatura de coleóptilos em direção à luz. Os coleóptilos curvam-se por causa das taxas desiguais de alongamento celular, do lado sombreado *versus* o lado iluminado (ver Figura 19.1). A capacidade da auxina na regulação da taxa de alongamento celular vem fascinando os pesquisadores por muito tempo. Nesta seção será revisada a fisiologia do alongamento celular induzido pela auxina, incluindo alguns aspectos que foram discutidos no Capítulo 15.

As auxinas promovem o crescimento de caules e coleóptilos e inibem o crescimento de raízes

Conforme discutido, a auxina é sintetizada no ápice caulinar e transportada em direção basípeta aos tecidos localizados abaixo do ápice. O suprimento constante de auxina que chega à região subapical do caule ou do coleóptilo é necessário ao alongamento contínuo dessas células. Como o nível de auxina endógena na região de alongamento de uma planta sadia normal está próximo do ótimo para o crescimento, a aspersão da planta com auxina exógena resulta em um modesto e breve estímulo no crescimento, podendo até ser inibitório, no caso de plântulas que crescem no escuro, as quais são mais sensíveis a concentrações supra-ótimas de auxina do que as plantas que crescem em presença de luz.

Entretanto, quando a fonte endógena de auxina é removida por excisão das regiões contendo as zonas de alongamento, a taxa de crescimento decresce rapidamente a uma taxa basal baixa. Freqüentemente, tais regiões excisadas respondem de forma intensa à auxina exógena pelo rápido aumento de sua taxa de crescimento aos níveis observados na planta intacta.

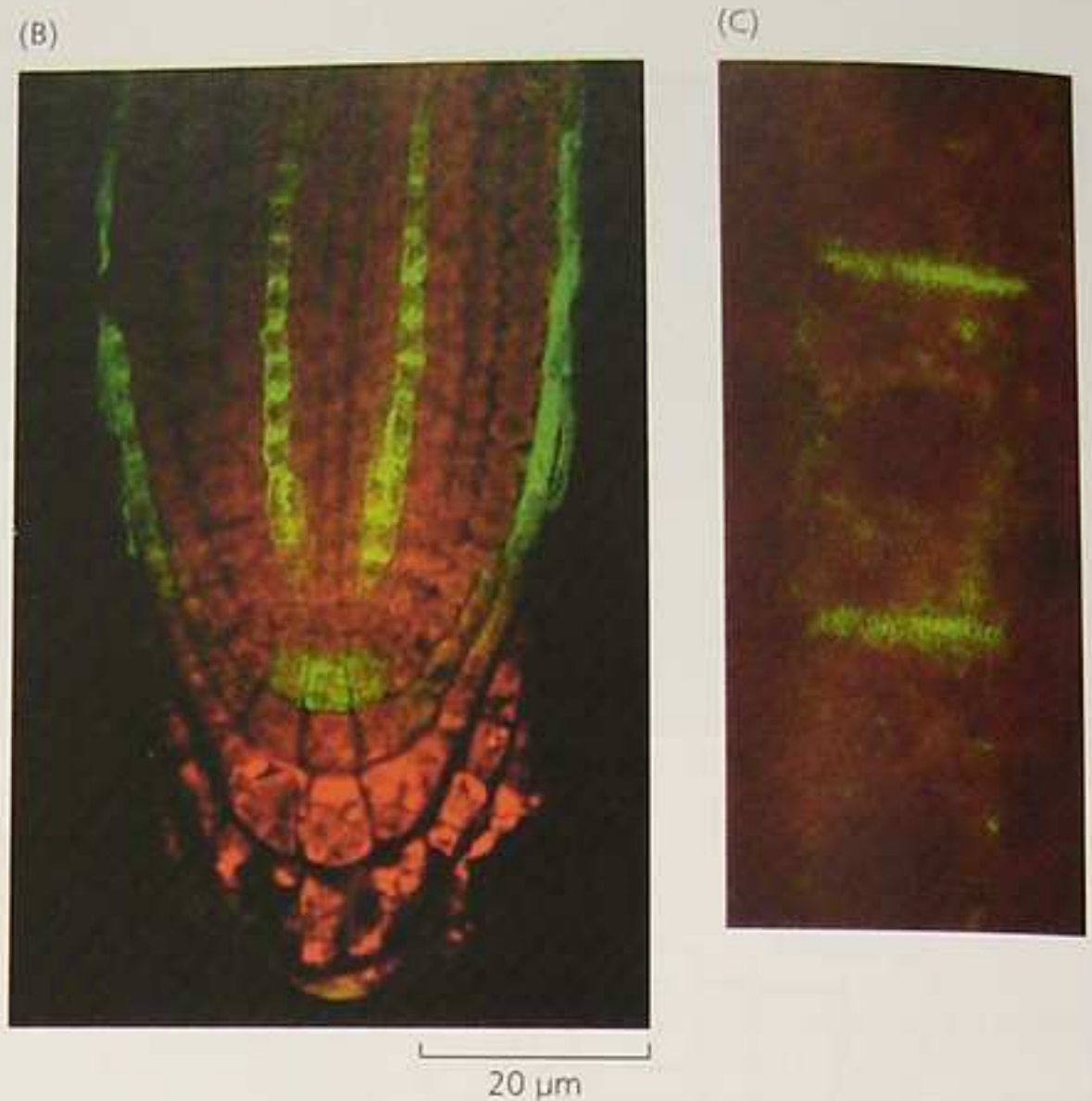
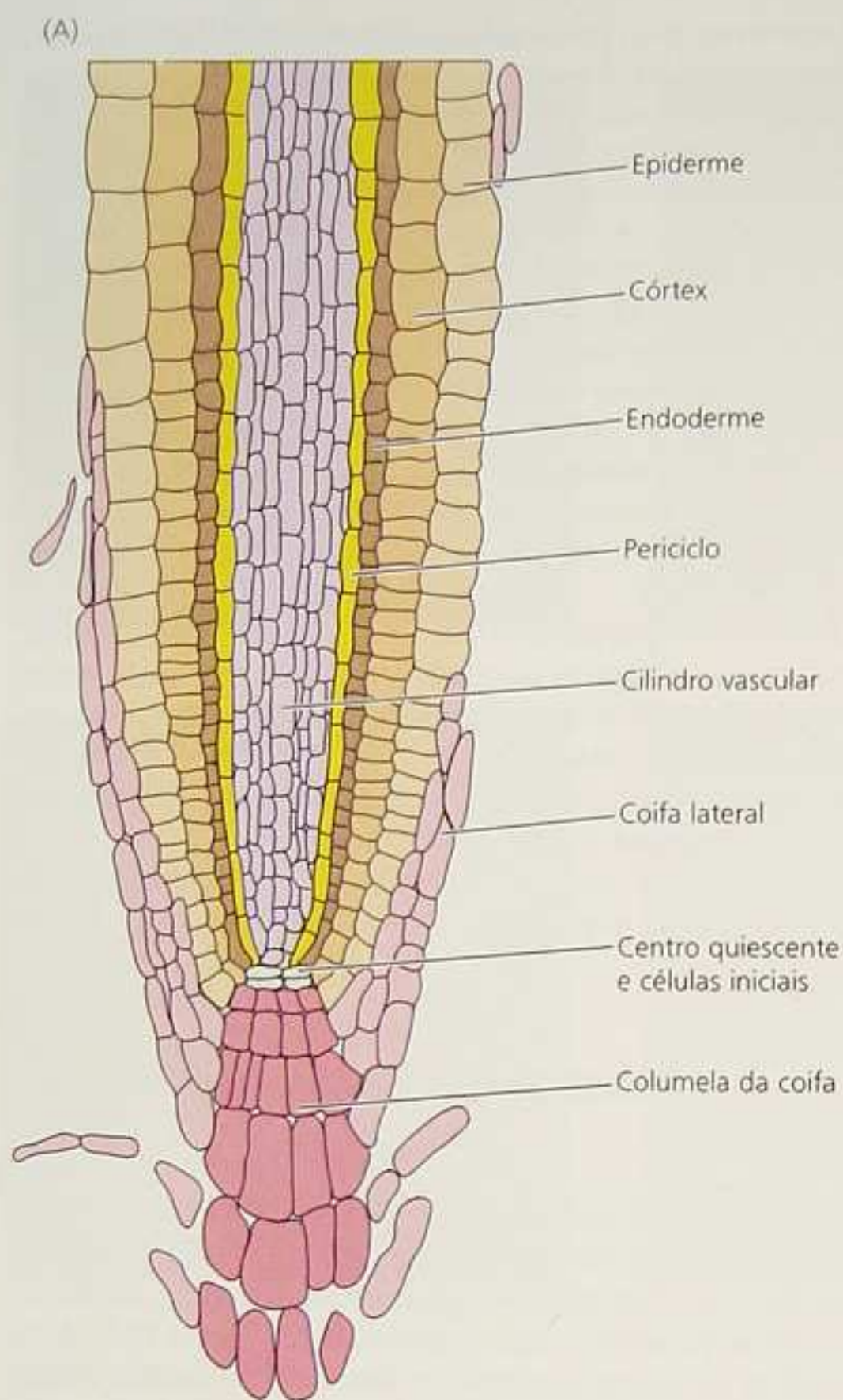



FIGURA 19.19 A permease de auxina AUX1 é especificamente expressa nas células da columela, da cobertura lateral da raiz e dos tecidos do estelo. (A) Diagrama dos tecidos do ápice da raiz de *Arabidopsis*. (B) Imunolocalização da AUX1 nas células do protofloema do estelo, em um grupo de células da columela e nas células da cobertura lateral da raiz. (C) Localização assimétrica de AUX1 em uma fileira de células do protofloema. (Swarup e cols., 2001).

Em experimentos de longo prazo, o tratamento de segmentos excisados de coleóptilos (ver Figura 19.2) ou de caules de dicotiledôneas com auxina estimula a taxa de alongamento do segmento por até 20 horas (Figura 19.20). A concentração ótima de auxina para o alongamento está tipicamente entre 10^{-6} e 10^{-5} M (Figura 19.21). A inibição, além da concentração ótima, é em geral atribuída à biossíntese de etileno induzida por auxina. Conforme será discutido no Capítulo 22, o hormônio gasoso etileno inibe o alongamento do caule em muitas espécies.

O controle do alongamento da raiz exercido pela auxina tem sido mais difícil de demonstrar, talvez porque a auxina induza a produção de etileno, um inibidor do crescimento de raiz. No entanto, mesmo se a biossíntese de etileno for especificamente bloqueada, baixas concentrações de auxina (10^{-10} a 10^{-9} M) promovem o crescimento de raízes intactas, enquanto altas concentrações (10^{-6} M) inibem o crescimento. Assim, as raízes podem necessitar de uma concentração mínima de auxina para crescer, mas o crescimento da raiz é fortemente inibido por concentrações de auxina que promovam o alongamento de caules e coleóptilos.

Os tecidos externos do caule de dicotiledôneas são alvo da ação da auxina

Os caules de dicotiledôneas são compostos de muitos tipos de tecidos e células, mas apenas alguns podem limitar a taxa de crescimento. Esse aspecto é ilustrado por um simples experimento. Quando seções de regiões com crescimento ativo de um caule estiolado de dicotiledônea, como ervilha, são divididas no sentido longitudinal e incubadas em tampão, as metades curvam-se para fora.

Esse resultado indica que, em ausência de auxina, os tecidos centrais, incluindo a medula, os tecidos vasculares e o córtex interno, alongam mais rápido do que os tecidos externos (córtex externo e epiderme). Assim, os tecidos externos podem estar limitando a taxa de crescimento do caule em ausência de auxina. Entretanto, quando as seções são incubadas em tampão com adição de auxina, as metades curvam-se para dentro, demonstrando que os tecidos externos dos caules de dicotiledôneas são os principais alvos da ação da auxina durante o alongamento celular.

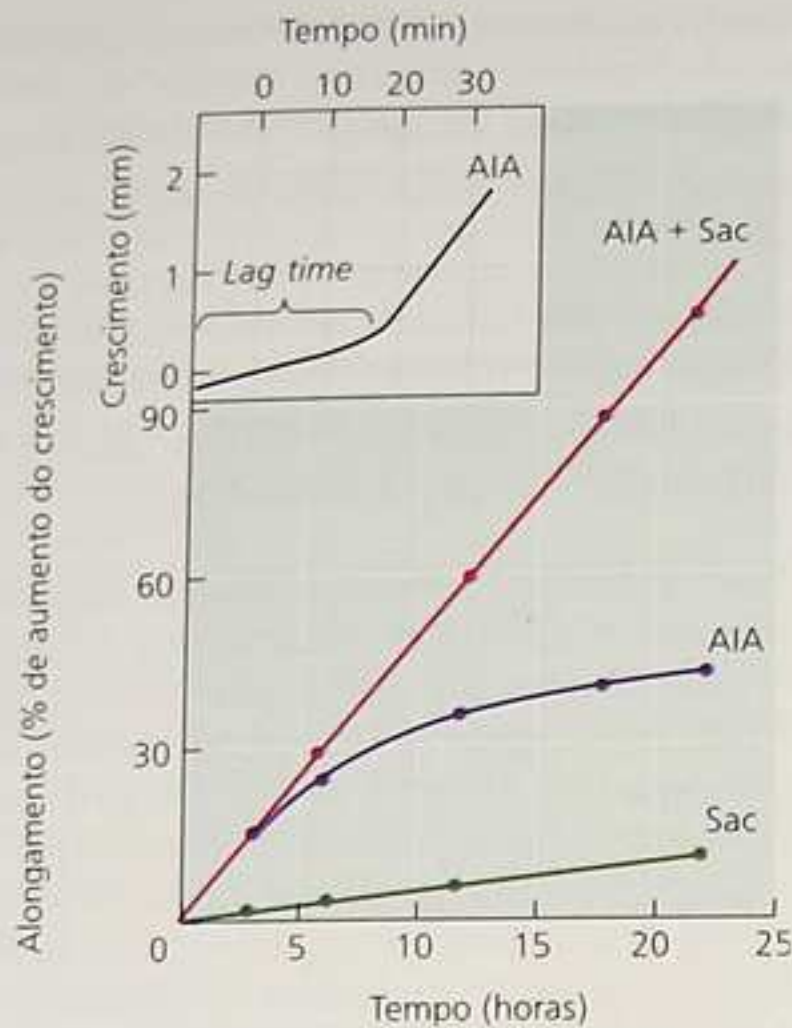



FIGURA 19.20 Intervalo de tempo para o crescimento induzido por auxina em segmentos de coleóptilos de *Avena* (aveia). O crescimento é plotado como incremento percentual do crescimento. A auxina foi adicionada no tempo zero. Quando a sacarose (Sac) é adicionada ao meio, a resposta pode continuar por até 20 horas, prolongando a resposta de crescimento à auxina, sobretudo por fornecer soluto osmoticamente ativo, que pode ser absorvido para a manutenção da pressão de turgor durante o alongamento celular. O KCl pode substituir a sacarose. O gráfico do detalhe apresenta o resultado do crescimento, em escala menor de tempo, plotado a partir de leituras de um transdutor eletrônico com sensor de posição. No gráfico, o crescimento é plotado em valores absolutos de milímetros *versus* tempo. A curva mostra um *lag time* de cerca de 15 minutos para que o crescimento estimulado por auxina inicie (Cleland, 1995).

A observação de que as camadas celulares externas são alvos da auxina parece ser conflitante com a localização do transporte polar nas células parenquimáticas dos feixes vasculares. No entanto, a auxina pode se mover lateralmente do tecido vascular dos caules de dicotiledôneas para tecidos externos na zona de alongamento. Em coleóptilos, por outro lado, todos os tecidos não-vasculares (epiderme e mesofilo), além de serem capazes de transportar auxina, apresentam resposta a esse hormônio.

O *lag time* mínimo de resposta para o crescimento induzido por auxina é de dez minutos

Quando um segmento de coleóptilo ou de caule é removido e colocado em um equipamento para medição de crescimento, a resposta ao crescimento pode ser monitorada com alta precisão. Sem auxina no meio, a taxa de crescimento declina rapidamente. A adição de auxina estimula claramente a taxa de crescimento após um *lag time* de 10 a 12 minutos (ver o detalhe do gráfico da Figura 19.20).

Os coleóptilos de aveia (*Avena*) e os hipocótilos de soja (*Glycine max*) atingem o máximo da taxa de crescimento em 30 a 60 minutos após tratamento com auxina (Figura 19.22). Esse máximo representa um aumento de 5 a 10 vezes sobre a taxa basal. As seções de coleóptilos de aveia podem manter esta taxa máxima de crescimento por até 18 horas em presença de solutos osmoticamente ativos, tais como sacarose ou KCl.

Como seria esperado, o estímulo de crescimento pela auxina necessita de energia, e os inibidores metabólicos inibem a resposta em poucos minutos. O crescimento induzido por auxina é também sensível a inibidores de síntese de proteínas, como a cicloeximida, sugerindo que estão envolvidas proteínas com altas taxas de reciclagem. Os inibidores da síntese de RNA também inibem esse processo, após um período um pouco mais longo (Cleland, 1995).

A duração do *lag time* do crescimento estimulado por auxina possa ser aumentada pela diminuição da temperatura ou pelo uso de concentrações subótimas de auxina, embora não possa ser diminuída pelo aumento da temperatura, pelo uso de concentrações supra-ótimas de auxina ou pela abrasão da camada cuticular para permitir a penetração mais rápida da auxina no tecido. Assim, o *lag time* mínimo de dez minutos não é determinado pelo tempo necessário para a auxina atingir seu sítio de ação. Mais propriamente, o *lag time* reflete o tempo necessário para o sistema bioquímico efetuar o aumento na taxa de crescimento.

A auxina aumenta rapidamente a extensibilidade da parede celular

Como a auxina provoca o aumento de cinco a 10 vezes na taxa de crescimento em apenas dez minutos? Para entender esse mecanismo, é preciso primeiro revisar o processo de expansão ce-

FIGURA 19.21 Curva típica de dose-resposta do crescimento induzido pelo AIA em segmentos de caule de ervilha ou de coleóptilos. O alongamento das seções removidas de coleóptilos ou caules jovens é plotado contra as concentrações crescentes de AIA exógeno. Em concentrações altas (acima de $10^{-5}M$), o AIA se torna cada vez menos efetivo; acima de $10^{-4}M$, torna-se inibitório, como demonstrado pela queda da curva abaixo da linha pontilhada, a qual representa o crescimento sem adição de AIA.

FIGURA 19.22 Comparação da cinética de crescimento de seções de coleóptilos de aveia e de hipocótilos de soja, incubadas com 10 mM de AIA e 2% de sacarose. O crescimento é plotado como a taxa obtida em cada tempo, em vez da taxa de crescimento absoluto. A taxa de crescimento dos hipocótilos de soja oscila após uma hora, enquanto que a de coleóptilos de aveia permanece constante.

lular nos vegetais (ver Capítulo 15). As células vegetais expandem-se em três etapas:

1. A absorção osmótica da água pela membrana plasmática é acionada por um gradiente de potencial hídrico ($\Delta\Psi_w$).
2. A pressão de turgor aumenta devido à rigidez da parede celular.
3. Ocorre o afrouxamento bioquímico da parede, permitindo à célula expandir-se em resposta à pressão de turgor.

Os efeitos de tais parâmetros são condensados na equação da taxa de crescimento:

$$TC = m\,(\Psi_p - Y),$$

onde TC é a taxa de crescimento, Ψ_p é a pressão de turgor, Y é o limiar de cedência e m é o coeficiente (*extensibilidade da parede*) que relaciona a taxa de crescimento à diferença entre Ψ_p e Y.

Em princípio, a auxina poderia aumentar a taxa de crescimento por aumentar m ou Ψ_p ou ainda diminuindo Y. Embora extensivos experimentos tenham demonstrado que a auxina não aumenta a pressão de turgor quando estimula o crescimento, resultados conflitantes foram obtidos no que diz respeito ao decréscimo de Y, induzido por auxina. No entanto, há uma concordância geral de que a auxina provoca aumento no parâmetro de extensibilidade da parede, m.

A extrusão de prótons induzida por auxina acidifica a parede celular e aumenta a extensão celular

De acordo com a **hipótese do crescimento ácido**, amplamente aceita, os íons de hidrogênio agem com intermediários entre a auxina e o afrouxamento da parede celular. A fonte dos íons de hidrogênio é a H^+-ATPase da membrana plasmática, que tem sua atividade aumentada em resposta à auxina. A hipótese do crescimento ácido leva em consideração cinco suposições:

1. Os tampões ácidos deveriam promover o crescimento em período curto, desde que a cutícula tenha sofrido abrasão para permitir o acesso dos prótons à parede celular.
2. A auxina deveria aumentar a taxa de extrusão de prótons (acidificação da parede) e a cinética da extrusão dos prótons deveria se igualar àquela do crescimento induzido por auxina.
3. Os tampões neutros deveriam inibir o crescimento induzido por auxina
4. Os compostos (outros além da auxina) que promovem a extrusão de prótons deveriam estimular o crescimento.
5. As paredes celulares deveriam conter um "fator de afrouxamento da parede" em um pH ácido ótimo.

Estas cinco suposições foram confirmadas. Tampões ácidos causam um aumento rápido e imediato na taxa de crescimento, desde que a cutícula tenha sido desgastada. A auxina estimula a extrusão de prótons na parede celular após um período de 10 a 15 minutos, consistente com a cinética de crescimento (Figura 19.23).

Foi demonstrado que o crescimento induzido por auxina é inibido por tampões neutros, desde que a cutícula tenha sofrido abrasão. A **fusicocina**, uma toxina fúngica, estimula tanto a extrusão rápida de prótons quanto o crescimento temporário em seções de caule e coleóptilos (ver **Tópico 19.6 na Internet**). Finalmente, as proteínas que participam do afrouxamento da parede, denominadas **expansinas**, foram identificadas nas paredes celulares de uma grande variedade de espécies (ver Capítulo 15). Em valores ácidos de pH, as expansinas afrouxam as paredes celulares pelo enfraquecimento das pontes de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede celular.

A extrusão de prótons induzida por auxina pode envolver ativação e síntese

Em teoria, a auxina poderia aumentar a taxa de extrusão de prótons por dois possíveis mecanismos:

1. Ativação das H^+-ATPases preexistentes na membrana plasmática

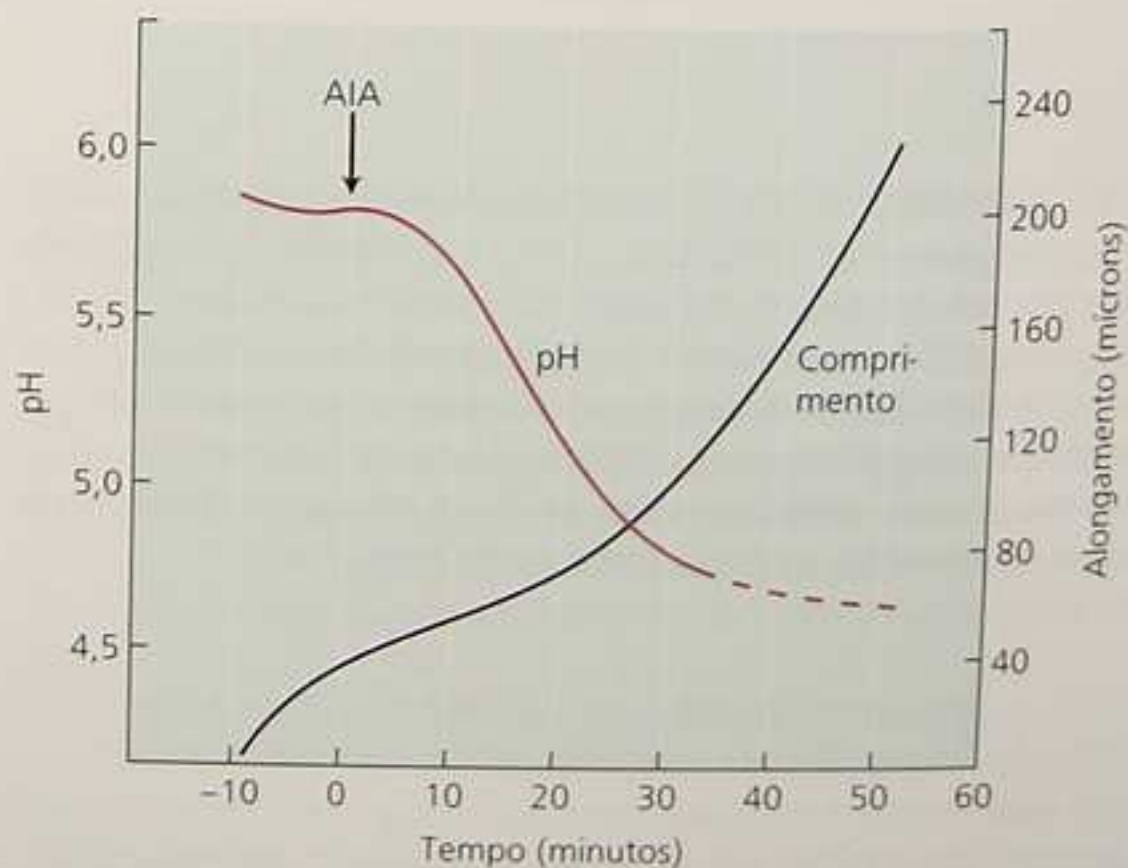



FIGURA 19.23 Cinética do alongamento e da acidificação da parede celular induzidos por AIA, em coleóptilos de milho. O pH da parede celular foi medido com um microeletrodo. Observe os *lag times* similares (10 a 15 minutos) tanto para a acidificação da parede celular quanto para o aumento na taxa de alongamento (Jacobs e Ray, 1976).

2. Síntese de novas H^+-ATPases na membrana plasmática

Ativação da H^+-ATPase. Quando a auxina é adicionada diretamente às vesículas isoladas de membrana plasmática de células de tabaco, é observado um pequeno estímulo (cerca de 20%) da atividade de bombeamento de prótons para produção de ATP, sugerindo que a auxina ativa diretamente a H^+-ATPase. Observou-se um estímulo maior (cerca de 40%) quando células vivas foram tratadas com AIA imediatamente antes de as membranas terem sido isoladas, indicando que um fator celular também é necessário (Peltier e Rossignol, 1996).

Embora um receptor de auxina não tenha ainda sido identificado (conforme será discutido posteriormente neste capítulo), várias proteínas de ligação à auxina (ABPs) foram isoladas e parecem ser capazes de ativar a H^+-ATPase da membrana plasmática em presença de auxina (Steffens e cols., 2001).

Recentemente, foi demonstrado que uma ABP de arroz, ABP_{57}, era capaz de se ligar diretamente à H^+-ATPase da membrana plasmática e estimular a extrusão de prótons — mas somente em presença de AIA (Kim e cols., 2001). Na ausência de AIA, a atividade da H^+-ATPase é reprimida pelo domínio C-terminal da enzima, que pode bloquear o sítio catalítico. A ABP_{57} (ligada ao AIA) interage com a H^+-ATPase, ativando a enzima. Um segundo sítio de ligação da auxina interfere na ação do primeiro, possivelmente explicando a curva em forma de sino, correspondente à ação da auxina. Esse modelo hipotético para a ação da ABP_{57} é mostrado na Figura 19.24.

Síntese da H^+-ATPase. A capacidade dos inibidores da síntese de proteínas, como a cicloeximida, em inibir rapidamente a extrusão de prótons e o crescimento induzidos por auxina sugere que esse hormônio poderia também estimular o bombeamento de prótons por aumentar a síntese de H^+-ATPase. Um aumento na quantidade dessa enzima em coleóptilos de milho foi detectado imunologicamente cinco minutos após o tratamento com auxina e a duplicação da quantidade de H^+-ATPase foi observada após 40 minutos do tratamento. Um aumento de três vezes na produção de um mRNA para a síntese de H^+-ATPase, como resultado da indução pela auxina, foi demonstrado especificamente em tecidos não-vasculares dos coleóptilos.

Em resumo, a questão da ativação *versus* síntese ainda não está resolvida e é possível que a auxina estimule a extrusão de prótons por ambos processos. A Figura 19.25 resume os mecanismos propostos para o afrouxamento da parede via extrusão de prótons induzida por auxina.

EFEITOS FISIOLÓGICOS DA AUXINA: FOTOTROPISMO E GRAVITROPISMO

Os três principais sistemas de orientação do crescimento dos vegetais são:

1. **Fototropismo**, ou crescimento em relação à luz, é expresso em todas as partes aéreas e algumas raízes; garante que as folhas receberão luz solar suficiente para realizar a fotossíntese.
2. **Gravitropismo**, o crescimento em resposta à gravidade, possibilita que as raízes cresçam em direção ao solo e as partes aéreas em direção contrária, respostas que são extremamente críticas nos estádios iniciais da germinação.
3. **Tigmotropismo**, ou crescimento em resposta ao toque, permite que as raízes cresçam ao redor de rochas e é responsável pela capacidade das partes aéreas de ascender sobre outras plantas ou estruturas de suporte.

Nesta seção, serão examinadas as evidências de que a curvatura em resposta à luz ou à gravidade resulta na redistribuição lateral da auxina. Estarão sendo também considerados os mecanismos celulares envolvidos na formação dos gradientes laterais de auxina durante a curvatura. Pouco se sabe a respeito do mecanismo de tigmotropismo, embora ele, provavelmente, também envolva gradientes de auxina.

O fototropismo é mediado pela redistribuição lateral da auxina

Como foi visto, Charles e Francis Darwin apresentaram a primeira idéia com relação ao fototropismo, demonstrando que os

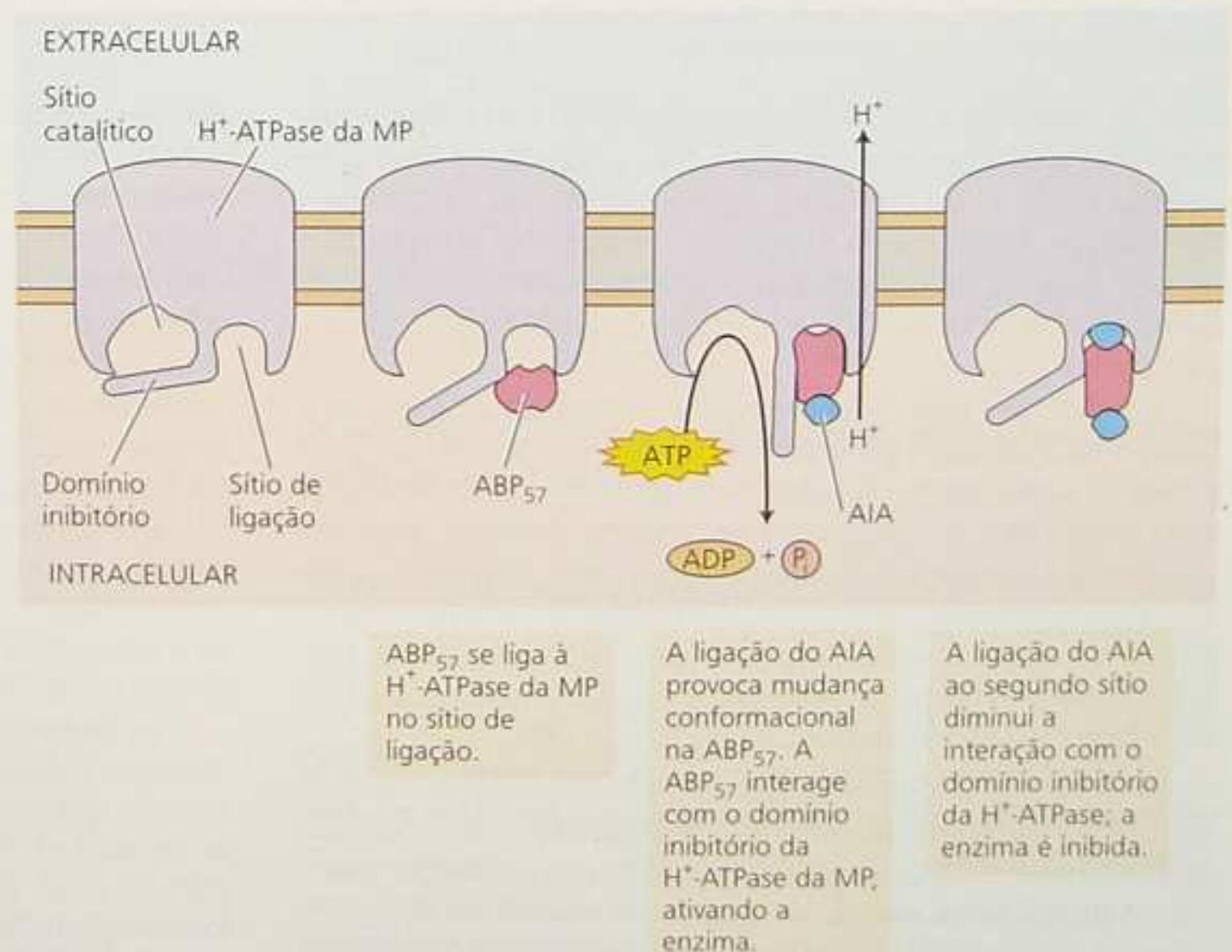



FIGURA 19.24 Modelo de ativação da H^+-ATPase da membrana plasmática (MP) por ABP_{57} e auxina.

Hipótese de ativação:
A auxina liga-se a uma proteína de ligação de auxina (ABP1), localizada na superfície celular ou no citosol. O complexo ABP1-AIA interage diretamente com a H^+-ATPase da membrana plasmática para estimular o bombeamento de prótons (etapa 1). Mensageiros secundários, como o cálcio ou o pH intracelular, podem também estar envolvidos.

Hipótese de síntese:
Mensageiros secundários induzidos por auxina ativam a expressão de genes (etapa 2) que codificam a síntese da H^+-ATPase da membrana plasmática (etapa 3). A proteína é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (etapa 4) e enviada para a membrana pela via secretora (etapas 5 e 6). O aumento da extrusão de prótons é o resultado do aumento no número de bombas de prótons na membrana.

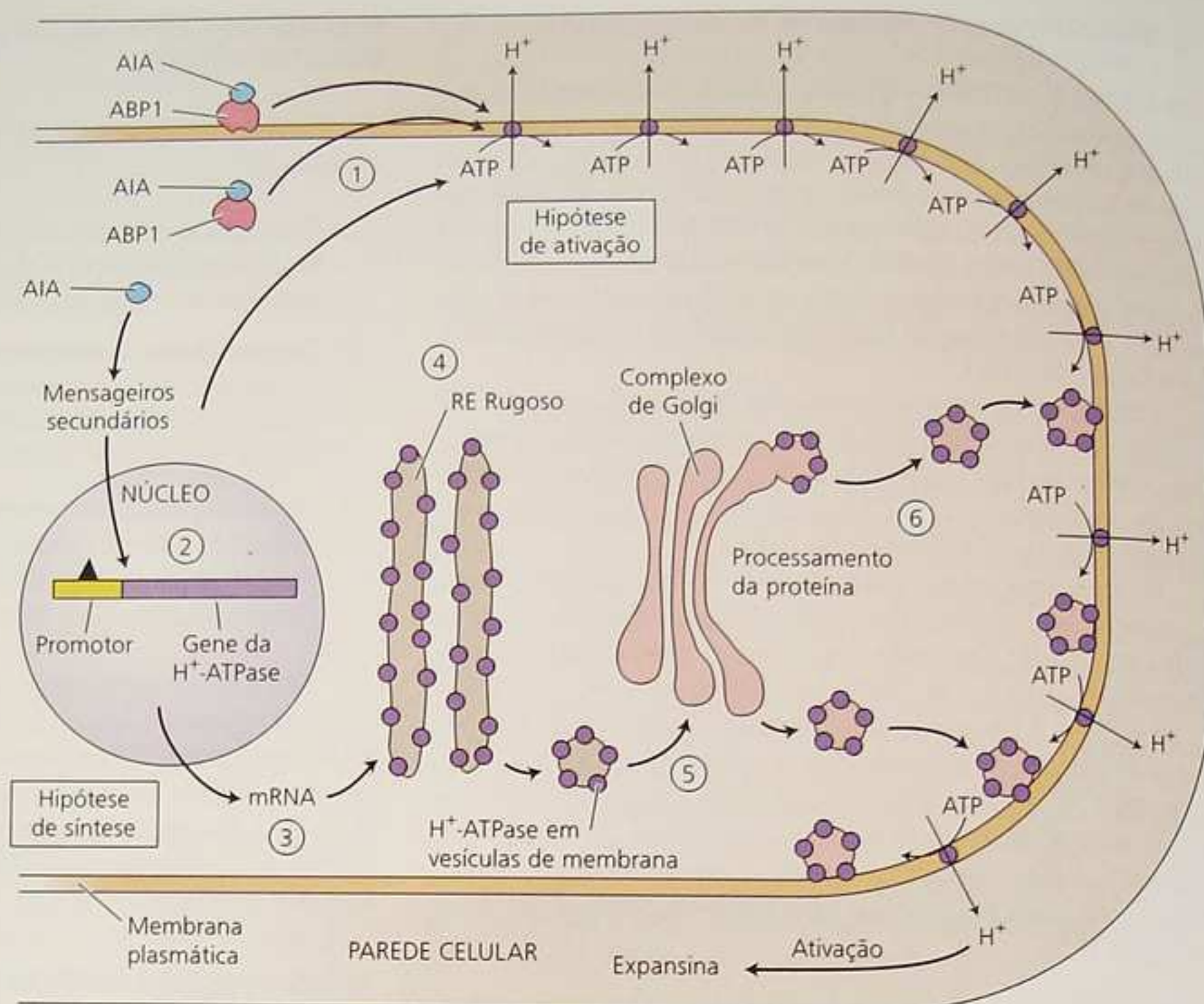



FIGURA 19.25 Modelos atuais de extrusão de H^+ induzido por AIA. Em muitas plantas, os dois mecanismos podem ocorrer. Independente de como o bombeamento de H^+ seja aumentado, o afrouxamento da parede induzido pela acidez é mediado pelas expansinas.

sítios de percepção e do crescimento diferencial (curvatura) estão separados: a luz é percebida no ápice, mas a curvatura ocorre abaixo desta região. Pai e filho propuseram que alguma "influência", transportada do ápice para a região de crescimento, era responsável pela resposta do crescimento assimétrico observada. Essa influência foi, mais tarde, determinada como ácido indol-3-acético, uma auxina.

Quando um broto está crescendo verticalmente, a auxina é transportada de modo polar da extremidade em crescimento para a zona de alongamento. A polaridade do transporte de auxina do ápice para a base é determinada pelo desenvolvimento e é independente da orientação com relação à gravidade. Entretanto, a auxina pode também ser transportada lateralmente e este movimento lateral é o centro do modelo para tropismos, originalmente proposto em separado pelos fisiologistas Nicolai Cholodny, da Rússia, e pelo holandês Frits Went, na década de 1920.

De acordo com o modelo de fototropismo Cholodny-Went, as extremidades dos coleóptilos de gramíneas apresentam três funções especializadas:

1. A produção da auxina.
2. A percepção de um estímulo unilateral de luz.
3. O transporte lateral de AIA em resposta ao estímulo fototrópico.

Assim, em resposta ao estímulo direcional da luz, a auxina produzida no ápice, em vez de ser transportada de forma basípeta, é transportada lateralmente para o lado sombreado.

Os locais exatos de produção da auxina, da percepção da luz e do transporte lateral têm sido difíceis de serem definidos. Em coleóptilos de milho, a auxina é produzida na região que compreende 1 a 2 mm do ápice. As regiões fotossensíveis e de transporte lateral estendem-se mais longe, cerca de 5 mm da extremidade. A resposta é também fortemente dependente da fluência (ver Tópico 19.7 na Internet).

Duas flavoproteinas, *fototropinas 1* e *2*, são fotorreceptores da rota de sinalização para luz azul (ver Ensaio 19.3 na Internet), que induzem a curvatura fototrópica em hipocótilos de *Arabidopsis* e coleóptilos de aveia sob condições de baixa e alta fluência (Briggs e cols., 2001).

As fototropinas são proteínas quinases autofosforilantes, com suas atividades estimuladas pela luz azul. O espectro de ação da ativação por luz azul da atividade quinase coincide com o espectro de ação para o fototropismo, incluindo múltiplos picos na região do azul. A fototropina 1 exibe um gradiente lateral de fosforilação durante a exposição a uma baixa fluência de luz azul unilateral.

De acordo com a hipótese atual, o gradiente na fosforilação da fototropina induz o movimento da auxina para o lado som-

breado do coleóptilo (ver **Tópico 19.7 na Internet**). Uma vez alcançado o lado sombreado, a auxina é transportada em direção basípeta para a zona de alongamento, onde estimula o alongamento celular. A aceleração do crescimento no lado sombreado e a diminuição no lado iluminado (crescimento diferencial) originam a curvatura em direção à luz (Figura 19.26).

Os testes do modelo proposto por Cholodny-Went, usando ensaios com blocos de ágar/curvatura de coleóptilo, têm dado suporte às suposições do modelo, nas quais a auxina, nos ápices dos coleóptilos, é transportada lateralmente em resposta à luz unilateral (Figura 19.27). A quantidade total de auxina que se difunde a partir da extremidade (aqui expressa como ângulo de curvatura) é a mesma tanto na presença de luz unilateral quanto na ausência da mesma (comparar Figura 19.27A e B). Tal resultado indica que a luz não causa a fotodestruição da auxina no lado iluminado, conforme proposto por alguns pesquisadores.

De modo consistente com as hipóteses de Cholodny-Went e do crescimento ácido, o pH apoplástico no lado sombreado de um caule ou coleóptilo em curvatura fototrópica é mais ácido do que o lado iluminado (Mulkey e cols., 1981).

O gravitropismo também envolve a redistribuição lateral de auxina

Quando plântulas de aveia crescidas no escuro são orientadas horizontalmente, os coleóptilos curvam-se em direção oposta à ação da gravidade. De acordo com o modelo de Cholodny-Went, a auxina, em um coleóptilo horizontal, é transportada lateralmente para a metade inferior, levando-a a crescer mais rápido que a metade superior. As evidências obtidas com os experimentos iniciais indicaram que o ápice do coleóptilo pode perceber a gravidade e redistribuir a auxina para a metade inferior. Por exemplo, se os ápices dos coleóptilos estão orientados horizontalmente, mais auxina se difunde para da metade inferior do que da metade superior (Figura 19.28).

Os tecidos abaixo do ápice também são capazes de responder à gravidade. Por exemplo, quando coleóptilos de milho, orientados verticalmente, têm seus ápices decapitados por remoção dos 2 mm apicais e orientados horizontalmente sem o ápice, a curvatura gravitrópica ocorre a uma taxa lenta por várias horas. A aplicação de AIA à superfície cortada restaura a taxa de curvatura aos níveis normais. Essa descoberta indica que tanto a percepção do estímulo gravitacional quanto a redistribuição lateral da auxina podem ocorrer em tecidos localizados abaixo do ápice, embora a extremidade seja necessária para a produção de auxina.

A redistribuição lateral de auxina nos meristemas apicais da parte aérea é mais difícil de ser demonstrada do que em coleóptilos, devido à presença desse hormônio nas folhas. Hoje em dia, marcadores moleculares, como os genes-repórteres, têm sido amplamente utilizados para detectar gradientes laterais de auxina em caules e raízes posicionados horizontalmente.

Em hipocótilos de soja, o gravitropismo leva a uma rápida assimetria no acúmulo de um grupo de RNAm estimulados por auxina, denominados **SAURs** (do inglês, *small auxin* **up-regulated** *RNAs*) (McClure e Guilfoyle, 1989). Em plântulas posicionadas verticalmente, a expressão dos genes SAUR é simetricamente distribuída. Em 20 minutos após a plântula ser orientada horizontalmente, os SAURs começam a se acumular na metade inferior do hipocótilo. Sob tais condições, a curvatura gravitrópica torna-se evidente nos primeiros 45 minutos, logo após a indução dos genes SAURs (ver **Tópico 19.8 na Internet**). A ocorrência de um gradiente lateral na expressão dos genes SAUR é indiretamente evidenciada pela existência de um gradiente lateral de auxina, detectável 20 minutos após o estímulo gravitacional.

Como será discutido posteriormente neste capítulo, a família gênica *GH3* é também ativada cinco minutos após o tratamento da auxina e tem sido utilizada como marcador molecular para a presença de auxina. Através da fusão de uma seqüência de promotor artificial baseada no promotor do gene *GH3* ao gene-repórter GUS, é possível visualizar o gradiente lateral na concentração de auxina que ocorre durante o fototropismo e o gravitropismo (Figura 19.29).

Os estatólitos funcionam como sensores da gravidade nas partes aéreas e nas raízes

Ao contrário da luz unilateral, a gravidade não forma um gradiente entre as metades inferiores e superiores de um órgão. Todas as partes da planta percebem igualmente o estímulo gravitacional. Como os vegetais percebem a gravidade? A única maneira pela qual a gravidade pode ser percebida é pelo movimento de um corpo em queda ou em sedimentação.

Os candidatos óbvios para servirem como sensores nos vegetais são os amiloplastos, grandes e densos, presentes em muitas células vegetais. Esses amiloplastos especializados apresentam alta densidade em relação ao citoplasma, de modo que rapidamente sedimentam na superfície inferior da célula (Figura 19.30). Os amiloplastos que funcionam como sensores da gravidade são chamados de **estatólitos** e as células especializadas em perceber o estímulo gravitacional nas quais eles ocorrem são os **estatócitos**. Ainda não

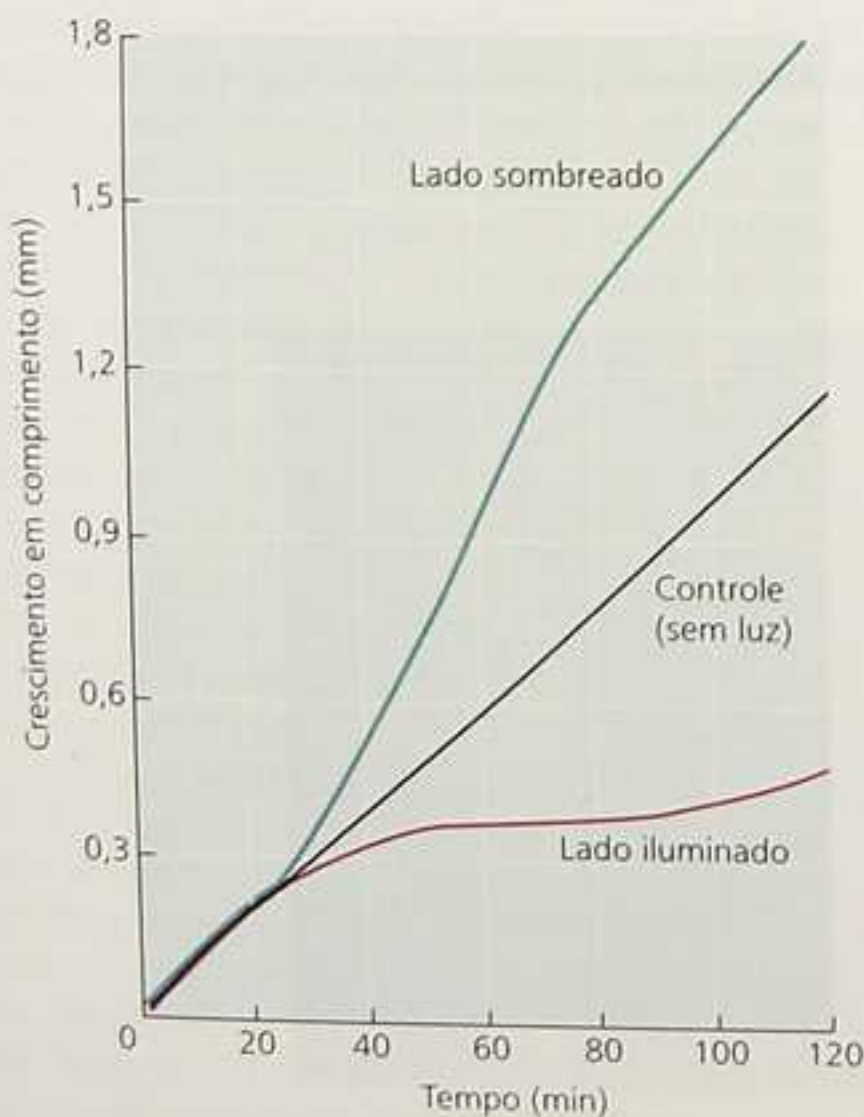



FIGURA 19.26 Crescimento dos lados iluminado e sombreado de um coleóptilo em relação ao tempo, respondendo a um pulso de 30 segundos de luz azul unidirecional. Aos coleóptilos-controle não foi dado o tratamento de luz (Iino e Briggs, 1984).

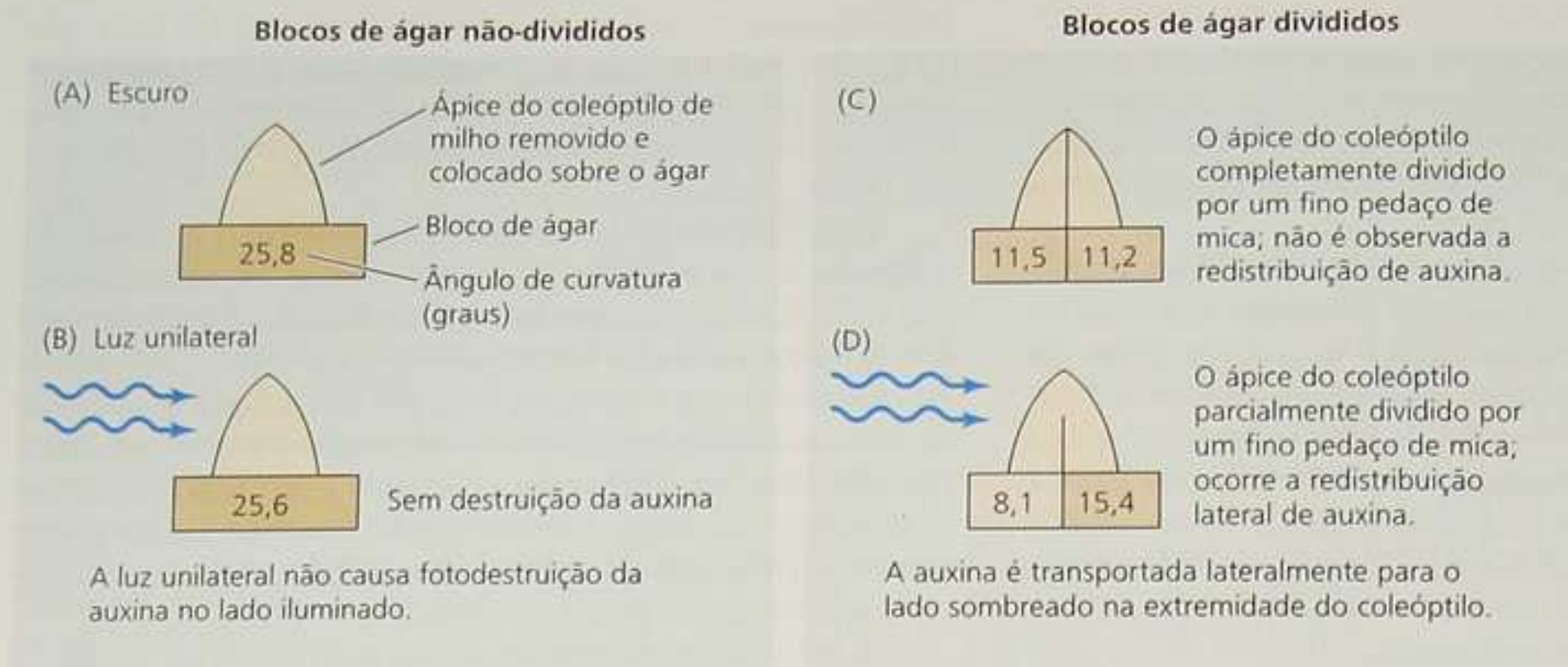



FIGURA 19.27 Evidência de que a redistribuição lateral da auxina é estimulada pela luz unidirecional em coleóptilos de milho.

está claro se o estatocisto é capaz de detectar o movimento descendente do estatólito, à medida que ele passa pelo citoesqueleto ou se o estímulo é percebido apenas quando o estatólito atinge a superfície inferior da célula.

Partes aéreas e coleóptilos. Em partes aéreas e coleóptilos, a gravidade é percebida na **bainha de amido**, uma camada de células que circunda os tecidos vasculares da parte aérea. A bainha de amido é contínua com a endoderme da raiz; porém, ao contrário da endoderme, ela possui amiloplastos. Os mutantes de *Arabidopsis* sem amiloplastos na bainha de amido apresentam a parte aérea agravitrópica, mas raiz com crescimento gravitrópico normal (Fujihira e cols., 2000).

Como visto no Capítulo 16, o mutante *scarecrow (scr)* não apresenta endoderme nem bainha de amido. Como resultado, o hipocótilo e a inflorescência do mutante *scr* são agravitrópicos, enquanto a raiz exibe uma resposta gravitrópica normal. Com base nos fenótipos desses dois mutantes, pode-se concluir que:

- A bainha de amido é necessária para o gravitropismo das partes aéreas.
- A endoderme da raiz, que não contém estatólitos, não é necessária para o gravitropismo das raízes.

Raízes. O local da percepção da gravidade em raízes primárias é a coifa. Amiloplastos grandes e com resposta à gravidade estão

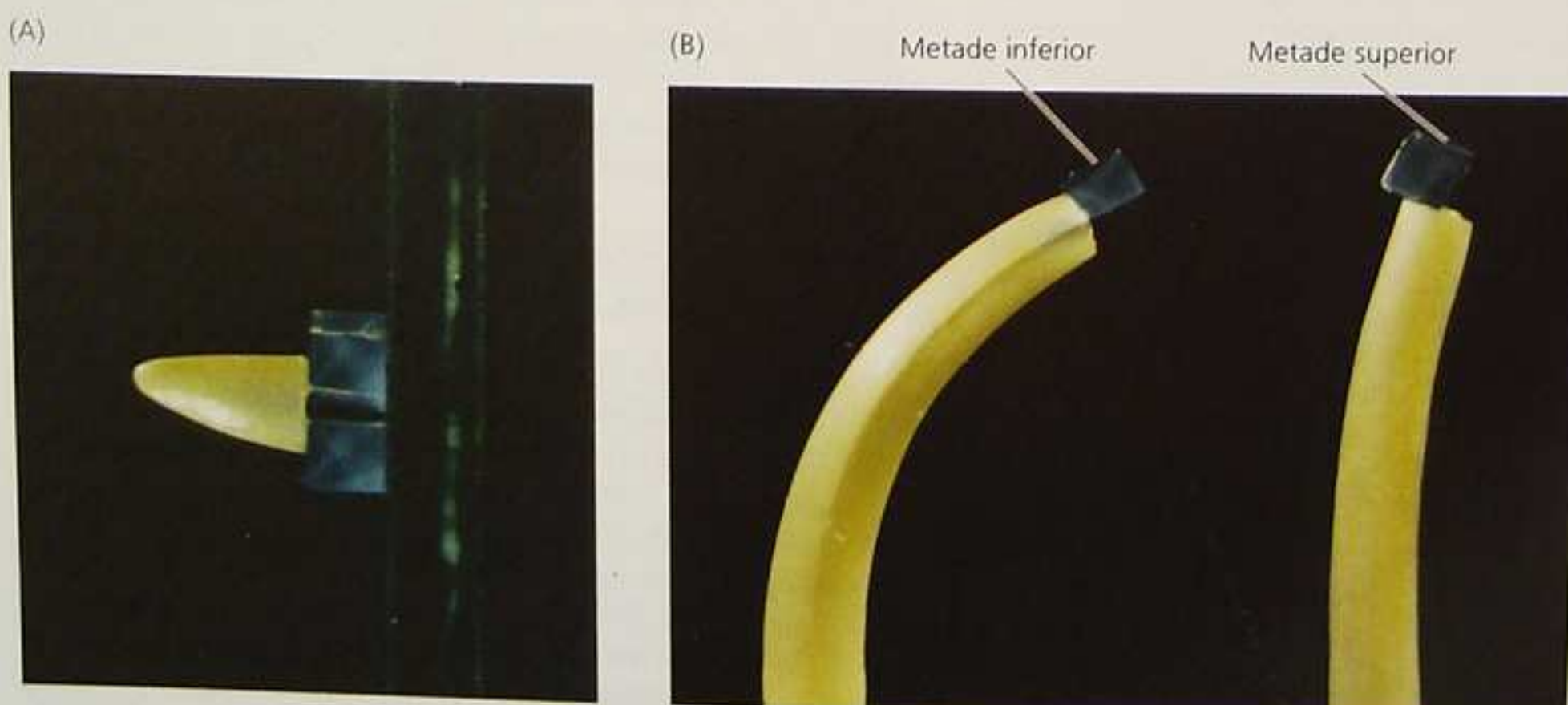



FIGURA 19.28 A auxina é transportada para a região inferior da extremidade do coleóptilo de aveia posicionado horizontalmente. (A) A auxina das metades superiores e inferiores de um ápice na posição horizontal difunde-se em dois blocos de ágar. (B) O bloco de ágar da metade inferior (esquerda) induz uma curvatura maior no coleóptilo decapitado do que o bloco de ágar da metade superior (direita) (fotografia © M. B. Wilkins).

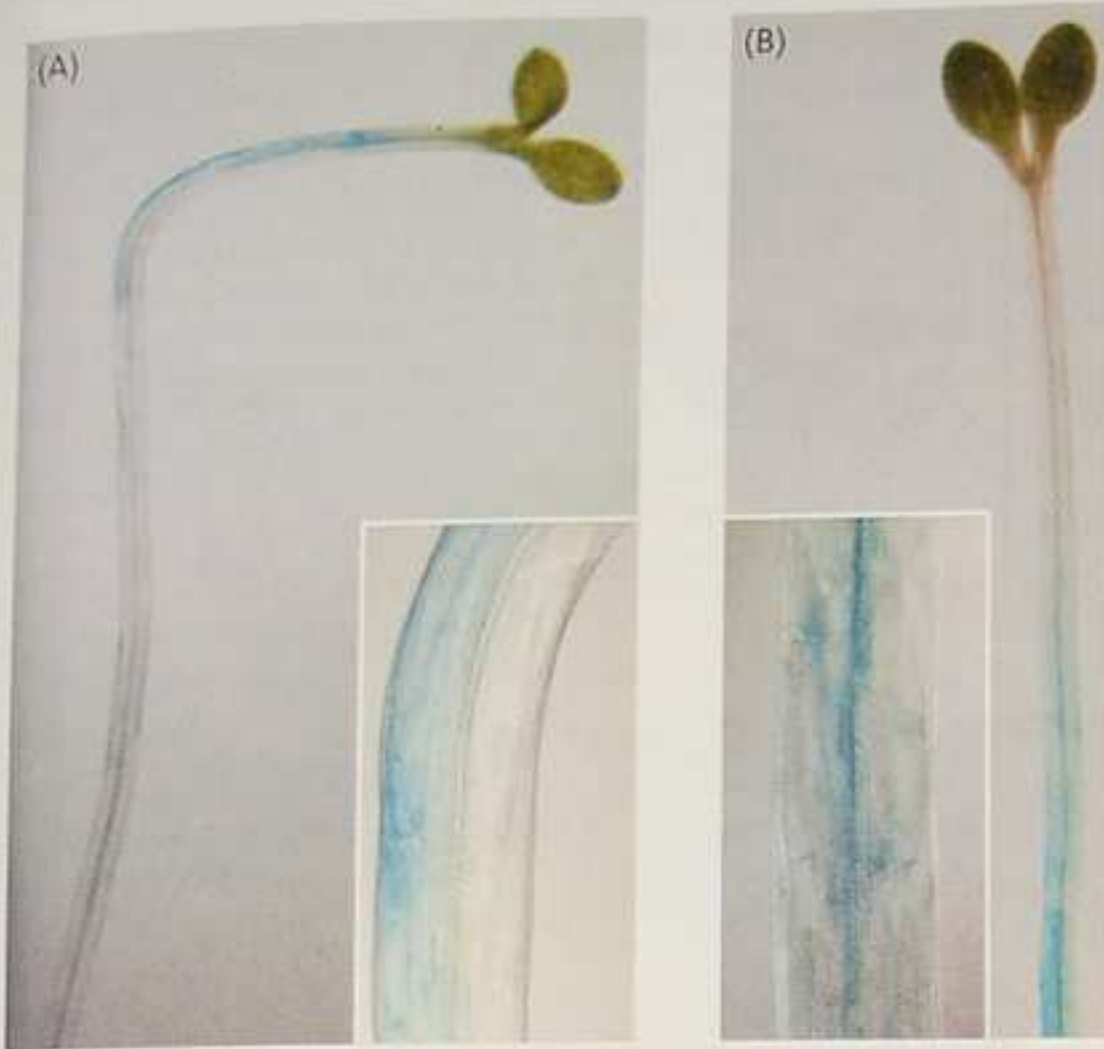



FIGURA 19.29 Os gradientes laterais de auxina são formados em hipocótilos de *Arabidopsis* durante as respostas de crescimento diferencial à luz (A) e à gravidade (B). As plantas foram transformadas com a construção *DR5::GUS*. O acúmulo de auxina no lado sombreado (A) ou na metade inferior do hipocótilo está indicado pela coloração azul ilustrada nas fotos menores (fotografias cedidas por Klaus Palme).

localizados nos estatócitos (ver Figura 19.30A e B) no cilindro central ou **columela** da coifa. A remoção da coifa de raízes intactas anula o gravitropismo das raízes, sem inibir o crescimento.

Ainda é pouco compreendido como os estatócitos percebem precisamente a sedimentação dos estatólitos. De acordo com uma hipótese, o contato ou a pressão resultante da sedimentação do amiloplasto sedimentando no retículo endoplasmático na metade inferior da célula desencadeia a resposta (ver Figura 19.30C). O retículo das células da columela é estruturalmente distinto, consistindo de cinco a sete lâminas de retículo endoplasmático rugoso ligadas a um eixo nodal central e dispostas em um arranjo circular, como as pétalas em uma flor. Este "RE-nodular" especializado difere das cisternas mais tubulares e corticais do RE e pode estar envolvido na resposta à gravidade (Zheng e Staehelin, 2001).

A **hipótese do estatólito-amido** da percepção da gravidade em raízes apresenta várias evidências. Os amiloplastos são as únicas organelas que sedimentam consistentemente nas células da columela de diferentes espécies vegetais e a taxa de sedimentação está correlacionada ao tempo necessário para perceber o estímulo da gravidade. As respostas gravitrópicas dos mutantes deficientes em amido são, em geral, muito mais lentas do que aquelas das plantas não-mutantes. Entretanto, os mutantes sem amido apresentam algum gravitropismo, sugerindo que embora o amido seja necessário para a resposta gravitrópica normal, o mecanismo de percepção da gravidade independente do amido pode também existir.

Outras organelas, como os núcleos, podem ter densidade suficiente para agirem como estatólitos. Talvez não seja necessário que o estatólito sedimente até a superfície inferior da célula. A rede do citoesqueleto pode ser capaz de detectar o deslocamento vertical parcial de uma organela.

Recentemente, Andrew Staehelin e colaboradores propuseram um novo modelo para o gravitropismo, denominado **modelo da tensogridade** (do inglês, *tensegrity model*) (Yoder e cols., 2001). *Tensogridade* é um termo usado na arquitetura — uma contração de *integridade tensiva* — proposto pelo arquiteto R. Buckminster Fuller. Por definição, *tensogridade* refere-se à integridade estrutural criada pela tensão interativa entre dois componentes estruturais. Nesse caso, os componentes estruturais consistem na rede de microfilamentos de actina, que formam parte do citoesqueleto das células central da columela da coifa. Supõe-se que a rede de actina esteja ancorada a receptores da membrana plasmática, ativados pela tensão. Em animais, tais receptores são tipicamente canais iônicos sensíveis ao estímulo mecânico e a presença de canais de cálcio ativados pela tensão foi demonstrada em plantas.

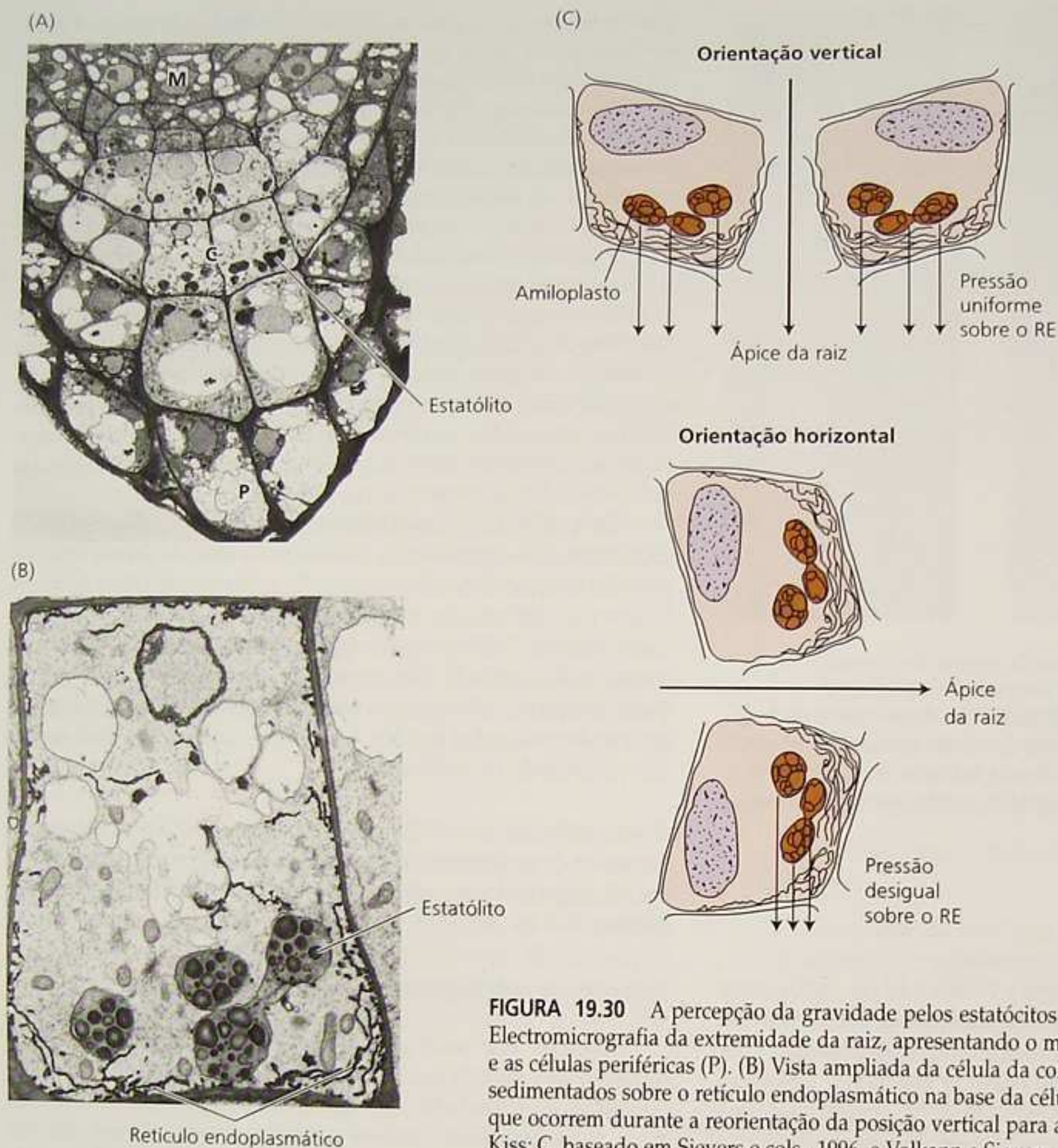
De acordo com o modelo da tensogridade, a sedimentação de estatólitos pelo citosol rompe localmente a rede de actina, mudando a distribuição da tensão transmitida aos canais de cálcio da membrana plasmática, alterando, assim, suas atividade. Yoder e colaboradores (2001) propuseram posteriormente que o RE nodal, o qual está conectado aos canais por microfilamentos de actina, pode proteger o citoesqueleto contra o rompimento pelos estatólitos em determinadas regiões, fornecendo, assim, um sinal para a direcionalidade do estímulo.

A percepção da gravidade sem estatólitos? Um mecanismo alternativo de percepção da gravidade que não envolve os estatólitos foi proposto para a alga de água doce *Chara*. Para detalhes, ver **Tópico 19.8 na Internet**.

A auxina é redistribuída lateralmente na coifa

Além de agir como protetora das células sensíveis do meristema apical à medida que a raiz penetra no solo, a coifa é o local de percepção da gravidade. Visto que a coifa está a certa distância da zona de alongamento, onde a curvatura ocorre, parece que um mensageiro químico está envolvido na comunicação entre a coifa e a zona de alongamento. Experimentos de microcirurgia, nos quais a metade da coifa foi removida, demonstraram que ela produz um inibidor de crescimento da raiz (Figura 19.31). Essa descoberta sugere que a coifa fornece um inibidor para a metade inferior da raiz durante a curvatura gravitrópica.

Embora as coifas das raízes contenham pequenas quantidades de AIA e de ácido abscísico (ABA) (ver Capítulo 23), o AIA é mais efetivo do que o ABA na inibição do crescimento das raízes, quando aplicado diretamente na zona de alongamento, sugerindo que o AIA é o inibidor da coifa. Coerente com essa conclusão, mutantes de *Arabidopsis* deficientes em ABA apresentam gravitropismo normal de raiz, enquanto raízes de mutantes defectivos no transporte de auxina, como *aux1* e *agr1*, são agravitrópicos (Palme e Gälweiler, 1999). Os mutantes *agr* são deficientes em um transportador de efluxo de auxina relacionado às proteínas PIN (Chen e cols., 1998; Müller e cols., 1998; Utsuno e cols., 1998). A proteína AGR1 está localizada na extremidade basal (distal) das células corticais próximas do ápice da raiz em *Arabidopsis*.

Como conciliar o fato de o meristema apical da parte aérea ser a principal fonte de auxina para a raiz com a função da coifa como fonte de uma auxina inibitória durante o gravitropismo? Confor-

(A)

(B)

(C)

FIGURA 19.30 A percepção da gravidade pelos estatócitos em *Arabidopsis*. (A) Electromicrografia da extremidade da raiz, apresentando o meristema apical (M), a columela (C) e as células periféricas (P). (B) Vista ampliada da célula da columela, indicando os amiloplastos sedimentados sobre o retículo endoplasmático na base da célula. (C) Diagrama das mudanças que ocorrem durante a reorientação da posição vertical para a horizontal (A, B cedidas por John Kiss; C, baseado em Sievers e cols., 1996, e Volkann e Sievers, 1979).

me já discutido neste capítulo, a auxina da parte aérea é translocada do estelo à extremidade da raiz através das células do protofloema. As permeases AUX1 localizadas assimetricamente nas células parenquimáticas do protofloema direcionam o transporte acrópeto da auxina a partir do floema a um grupo de células na columela da coifa. A auxina é, então, transportada radialmente para as células laterais da coifa, onde a AUX1 é também bastante expressa (ver Figura 19.19).

As células laterais da coifa sobrepõem-se à zona distal de alongamento (ZDA) da raiz — a primeira região que responde à gravidade. A auxina da coifa é absorvida pelo parênquima cortical da ZDA e transportada de forma basípeta por meio da zona de alongamento da raiz. Esse transporte basípeto, limitado pela zona de alongamento, é facilitado pelos transportadores aniônicos de auxina relacionados à família das proteínas PIN (chamados AGR1), os quais estão localizados nas extremidades basais das células do parênquima cortical.

A auxina transportada de forma basípeta acumula-se na zona de alongamento e não ultrapassa essa região. Os flavonóides capazes de inibir o efluxo de auxina são sintetizados nessa região da raiz e provavelmente promovem a retenção da auxina por estas células (Figura 19.32) (Murphy e cols., 2000).

De acordo com o modelo, o transporte basípeto de auxina em raízes orientadas verticalmente é igual nos dois lados (Figura 19.33A). No entanto, quando a raiz é posicionada horizontalmente, a coifa redireciona a maior parte da auxina para a metade inferior, inibindo, assim, o crescimento desse lado (Figura 19.33B). Coerente com tal idéia, o transporte de AIA[H^3] transversalmente na coifa orientada na posição horizontal é polar, com um movimento descendente preferencial (Young e cols., 1990).

(A)

Raiz-controle com a coifa, verticalmente orientada.

A remoção da coifa da raiz vertical estimula um pequeno crescimento por alongamento.

A remoção da metade da coifa leva à curvatura da raiz da posição vertical para o lado em que a coifa foi mantida.

Raiz

Coifa

(B)

Raiz-controle com coifa, orientada horizontalmente exibe curvatura gravitrópica normal.

A remoção da coifa de uma raiz na posição horizontal anula a resposta à gravidade, enquanto estimula um pequeno crescimento.

FIGURA 19.31 Experimentos de microcirurgia demonstrando que a coifa produz um inibidor que regula o gravitropismo da raiz (Shaw e Wlkins, 1973).

A PIN3 é lateralmente transferida para a metade inferior das células da columela da raiz

Recentemente, foi elucidado o mecanismo da redistribuição lateral da auxina na coifa (Friml e cols., 2002). Um dos membros da família das proteínas PIN de transportadores de efluxo de auxina, a PIN3, não somente é necessário para o fototropismo e para o gravitropismo em *Arabidopsis*, mas é transferida para a metade inferior das células da columela durante o gravitropismo da raiz (Figura 19.34).

Conforme mencionado, as proteínas PIN são ciclicamente incorporadas e removidas da membrana plasmática e dos compartimentos secretores intracelulares. Essa dinâmica permite que algumas proteínas PIN sejam direcionadas para partes específicas da célula em resposta a um estímulo direcional. Em raízes orientadas verticalmente, a PIN3 é distribuída de maneira uniforme em torno das células da columela (ver Figura 19.34A). Porém, quando a raiz é posicionada horizontalmente, a PIN3 é direcionada de preferência para a metade inferior da célula (ver Figura 19.34B). Como resultado, a auxina é transportada de modo polar para a metade inferior da coifa.

A percepção da gravidade pode envolver o cálcio e o pH como mensageiros secundários

Vários experimentos têm sugerido que a cálcio-calmodulina é necessária para o gravitropismo da raiz de milho. Alguns desses experimentos envolvem o EGTA (etileno glicol-bis(b-aminoetil éter)-N,N,N',N'-ácido tetracético), um composto que pode quelar (formar um complexo) íons cálcio, inibindo, assim, a absorção de cálcio pelas células. O EGTA inibe tanto o gravitropismo da raiz como a distribuição assimétrica da auxina em resposta à gravidade (Young e Evans, 1994).

Posicionando um bloco de ágar, contendo íons cálcio, ao lado da coifa de uma raiz de milho orientada verticalmente, ocorre a indução do crescimento da raiz em direção ao lado em que se encontra o bloco (Figura 19.35). Como no caso do AIA[H^3], o $^{45}Ca^{+2}$ é transportado de forma polar para a metade inferior da coifa de uma raiz estimulada pela gravidade. Entretanto, até então não foram detectadas mudanças na distribuição de cálcio intracelular nas células da columela em resposta ao estímulo gravitacional.

Evidências recentes sugerem que uma mudança no pH intracelular é a primeira alteração detectável nas células da columela em resposta à gravidade. Fasano e colaboradores (2001) usaram corantes sensíveis ao pH para monitorar o pH intra e extracelular em raízes de *Arabidopsis* após

Cotilédone e região apical

Zona de transição hipocótilo-raiz

Ápice da raiz

FIGURA 19.32 Localização de flavonóides em plântulas de *Arabidopsis* de seis dias. O procedimento de coloração usado causa a fluorescência dos flavonóides, os quais estão concentrados em três regiões: na apical e no cotilédone; na zona de transição hipocótilo-raiz e na área da extremidade da raiz (no detalhe). No ápice da raiz, os flavonóides estão situados especificamente na zona de alongamento e na coifa, tecidos envolvidos no transporte basípeto da auxina (Murphy e cols., 2000).

(A) **Orientação vertical**

1. O AIA é sintetizado na parte aérea e transportado pelo estelo até a raiz.

Córtex

Estelo

AIA

Zona de alongamento (síntese de flavonóides)

2. Quando a raiz está na posição vertical, os estatólitos da coifa sedimentam na base das células. A auxina, transportada em direção acrópeta na raiz através do estelo, é distribuída igualmente em ambos os lados da coifa. O AIA é, então, transportado em direção basípeta do córtex para a zona de alongamento, onde regula o alongamento celular.

Coifa

Célula da coifa (aumentada)

Estatólitos

(B) **Orientação horizontal**

6. O decréscimo de auxina na metade superior estimula o crescimento desta região. Como resultado, a raiz curva-se para baixo.

5. A alta concentração de auxina na metade inferior da raiz inibe o crescimento.

4. A maior parte da auxina da coifa é então transportada em direção basípeta no córtex na metade inferior da raiz.

3. Em uma raiz horizontal, os estatólitos sedimentam para a lateral das células da coifa, desencadeando o transporte polar de AIA para a metade inferior da coifa.

FIGURA 19.33 Modelo proposto para a redistribuição da auxina durante o gravitropismo em raízes de milho (Hasenstein e Evans, 1988).

terem sido posicionadas horizontalmente. Em dois minutos de estímulo gravitacional, o pH citoplasmático das células da columela da coifa aumentou de 7,2 para 7,6 e o pH do apoplasto diminuiu de 5,5 para 4,5. Tais alterações precederam qualquer curvatura trópica detectável por cerca de 10 minutos.

A alcalinização do citosol associada à acidificação do apoplasto sugere que a ativação da H^+-ATPase da membrana plasmática é um dos eventos iniciais que desencadeiam a percepção da gravidade ou a transdução de sinal.

EFEITOS DA AUXINA NO DESENVOLVIMENTO

Embora a auxina tenha sido descoberta originalmente em relação ao crescimento, esse hormônio também influencia praticamente todos os estádios do ciclo de vida de um vegetal, da germinação à senescência. Visto que o efeito da auxina depende da identidade do tecido-alvo, a resposta do tecido à auxina é determinada pelo seu programa genético de desenvolvimento, além de ser influenciada pela presença ou ausência de outras moléculas de sinalização. Como será visto neste e nos capítulos subseqüentes, a interação entre dois ou mais hormônios é um tema recorrente no desenvolvimento vegetal.

Nesta seção, serão examinados alguns processos adicionais de desenvolvimento regulados pela auxina, incluindo a dominância apical, a abscisão foliar, a formação de raízes laterais e a diferenciação vascular. Em toda a discussão, será admitido que o mecanismo primário de ação da auxina é comparável em todos os casos, envolvendo receptores e vias de transdução de sinais similares. O estado atual do nosso conhecimento das vias de sinalização de auxina será considerado no final deste capítulo.

A auxina regula a dominância apical

Na maioria das plantas superiores, o crescimento da gema apical inibe o crescimento das gemas laterais (axilares) — um fenômeno denominado **dominância apical**. A remoção do ápice caulinar (decapitação) em geral resulta no crescimento de uma ou mais gemas laterais. Não muito após a descoberta da auxina, foi descoberto que o AIA poderia agir como substituto para a dominância apical,

(A) Orientação vertical

10 µm

(B) Orientação horizontal

10 µm

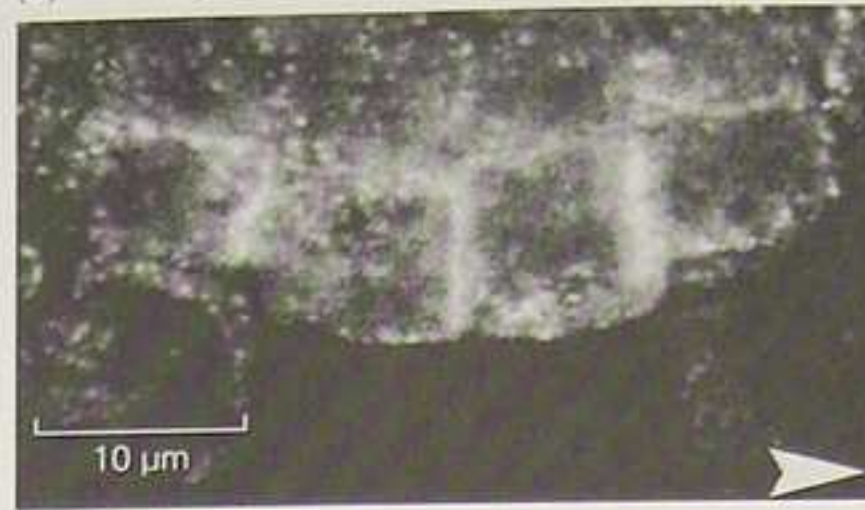



FIGURA 19.34 Alteração da localização do transportador PIN3 de efluxo de auxina durante o gravitropismo de raiz em *Arabidopsis*. (A) Em uma raiz orientada verticalmente, a PIN3 está distribuída de modo uniforme ao redor das células da columela. (B) Dez minutos após ser orientada horizontalmente, a PIN3 apresentou sua localização alterada para a metade inferior das células da columela. A fotografia em (B) foi reorientada de modo que o lado inferior está na direita (a direção da gravidade está indicada por setas) (Friml e cols., 2002, cedidas por Klaus Palme).

por manter a inibição de gemas laterais de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). O experimento clássico está ilustrado na Figura 19.36.

Esse resultado logo foi confirmado em várias outras espécies, levando à hipótese de que o crescimento das gemas axilares é inibido pela auxina que é transportada em direção basípeta a partir da gema apical. Em apoio a esta idéia, uma mistura de TIBA, inibidor do transporte de auxina, com pasta de lanolina (utilizada como suporte), colocada abaixo do ápice caulinar elimina a inibição das gemas axilares.

FIGURA 19.35 Uma raiz de milho com curvatura em direção ao bloco de ágar contendo cálcio, posicionado na coifa (cedida por Michael L. Evans).

Como a auxina produzida no ápice caulinar inibe o crescimento das gemas laterais? Kenneth V. Thimann e Folke Skoog propuseram originalmente que a auxina do ápice caulinar inibe de maneira direta o crescimento das gemas axilares — processo chamado de *modelo de inibição direta*. De acordo com esse modelo, a concentração ótima de auxina para o crescimento das gemas é baixa, muito mais baixa do que a concentração normalmente encontrada no caule. O nível de auxina presente no caule parece inibir o crescimento das gemas laterais.

Se o modelo da inibição direta de dominância apical estiver correto, a concentração de auxina nas gemas axilares deveria decrescer após a decapitação do ápice caulinar. No entanto, parece ocorrer o contrário. Isso foi demonstrado com plantas transgênicas que continham os genes-repórteres da luciferase bacteriana (*LUXA* e *LUXB*) sob o controle de um protomor que responde à auxina (Langridge e cols., 1998). Esses genes-repórteres permitiram aos pesquisadores estudar o nível de auxina presente nos diferentes tecidos, pelo monitoramento da quantidade de luz emitida pela reação catalisada pela luciferase.

Quando essas plantas transgênicas foram decapitadas, a expressão dos genes LUX aumentou em 12 horas nas gemas axilares e nos tecidos adjacentes. Tal experimento indicou que após a decapitação, o conteúdo de auxina das gemas axilares *aumentou* em vez de diminuir.

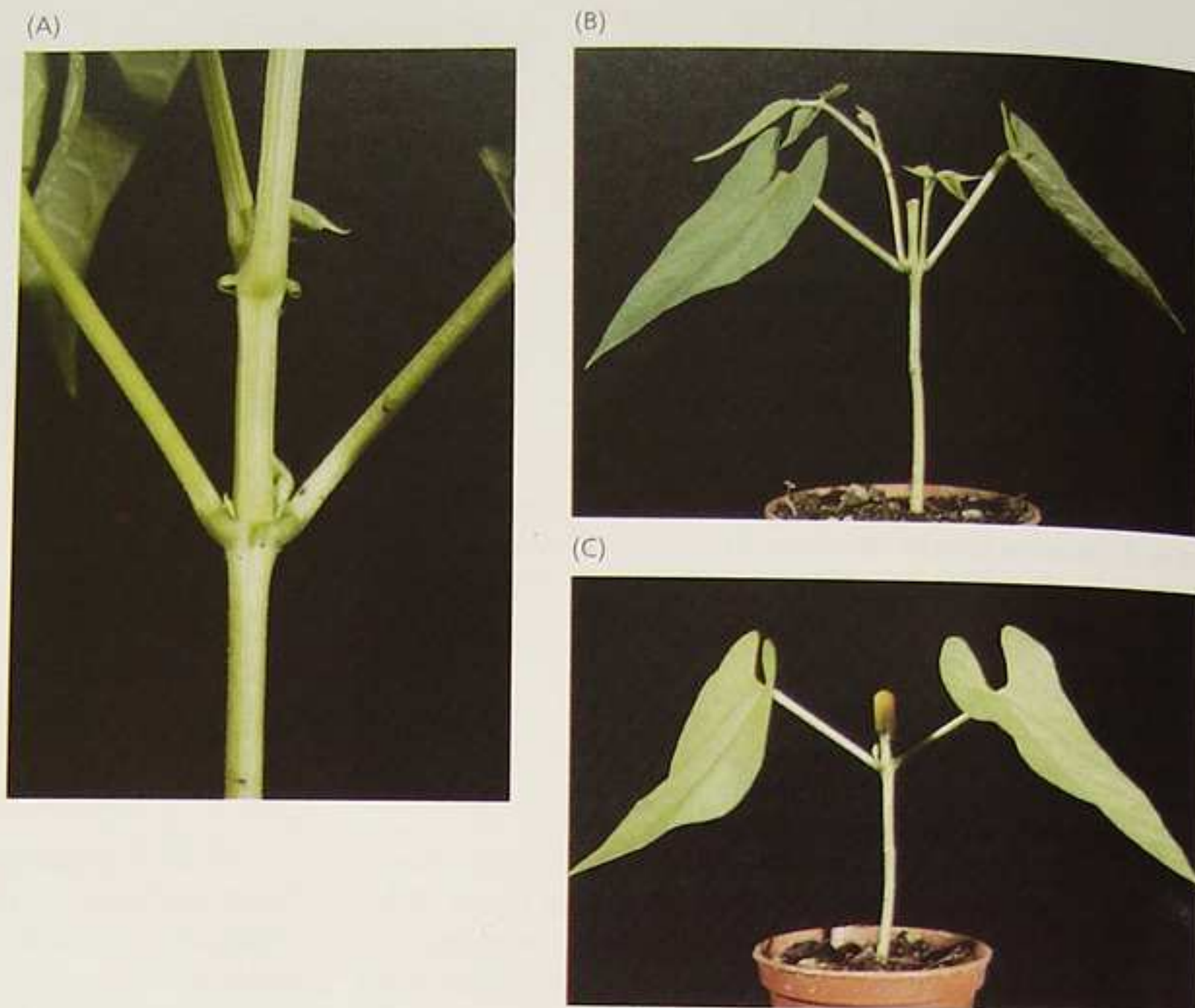
Medidas físicas diretas dos níveis de auxina nas gemas indicaram o aumento na concentração deste hormônio após a decapitação das gemas axilares. A concentração de IAA na gema axilar de *Phaseolus vulgaris* (feijão) aumentou cinco vezes em quatro horas após a decapitação (Gocal e cols., 1991). Estes e outros resultados semelhantes demonstraram ser improvável que a auxina do ápice caulinar iniba diretamente a gema axilar.

Outros hormônios, como as citocininas e o ABA, podem estar envolvidos. A aplicação direta de citocininas às gemas axilares estimula o crescimento dessas gemas em muitas espécies, suprimindo o efeito inibitório do ápice caulinar. A auxina faz do ápice caulinar um dreno para a citocinina produzida na raiz, e este pode ser um dos fatores envolvidos na dominância apical (ver **Tópico 19.10 na Internet**).

FIGURA 19.36 A auxina inibe o crescimento das gemas axilares em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). (A) As gemas axilares são inibidas em plantas intactas devido à dominância apical. (B) A remoção da gema terminal anula a dominância apical sobre as gemas laterais (setas). (C) Aplicando AIA em pasta de lanolina (contida em uma cápsula de gelatina) a uma superfície cortada previne o crescimento das gemas axilares (fotografias © M. B. Wilkins).

(A)

(B)

(C)

Por fim, o ABA foi encontrado em gemas laterais dormentes de plantas intactas. Quando o ápice caulinar é removido, os níveis de ABA nas gemas laterais diminuem. Altos níveis de AIA na parte aérea podem auxiliar a manter os níveis de ABA altos nas gemas laterais. A remoção dos ápices remove a fonte principal de AIA, o que pode permitir que os níveis do inibidor de crescimento de gemas diminuam (ver **Tópico 19.11 na Internet**).

A auxina promove a formação de raízes laterais e adventícias

Embora o alongamento da raiz primária seja inibido por concentrações de auxina maiores do que 10^{-8} *M*, a iniciação de raízes laterais (ramificadas) e raízes adventícias é estimulada por altos níveis de auxina. As raízes laterais são normalmente encontradas acima da zona de alongamento e pilífera, originando-se de pequenos grupos de células no periciclo (ver Capítulo 16). A auxina estimula as células do periciclo a se dividirem. As células em divisão gradualmente formam o ápice radicular e a raiz lateral cresce através do córtex e da epiderme da raiz.

As raízes adventícias podem surgir em uma grande variedade de tecidos a partir de agregados de células maduras que renovam sua atividade de divisão celular. Essas células em divisão desenvolvem-se em meristema apical de raiz de maneira análoga à formação de raízes laterais. Na horticultura, o efeito de estímulo da auxina na formação de raízes adventícias tem sido muito útil para a propagação vegetativa de plantas por estaquia.

Uma série de mutantes de *Arabidopsis*, denominados *alf* (do inglês, *aberrant lateral root formation*), forneceu algumas idéias do papel da auxina na iniciação de raízes laterais. O mutante *alf1* exibe uma proliferação extrema de raízes adventícias e laterais, relacionado com um aumento de 17 vezes no nível de auxina endógena (Figura 19.37).

Outro mutante, o *alf4*, apresenta o fenótipo oposto: é completamente desprovido de raízes laterais. As análises microscópicas das raízes do *alf4* indicam que os primórdios de raízes laterais estão ausentes. O fenótipo *alf4* não pode ser revertido pela aplicação de AIA exógeno.

O mutante *alf3* é defectivo no desenvolvimento dos primórdios de raízes laterais em raízes laterais maduras. A raiz primária é coberta por primórdios de raízes laterais que crescem somente até protrair pela camada de células da epiderme e, então, param de crescer. Esta parada no crescimento pode ser atenuada pela aplicação de AIA exógeno.

Com base nos fenótipos dos mutantes *alf*, foi proposto um modelo no qual o AIA é necessário para, pelo menos, duas etapas na formação de raízes laterais (Figura 19.38) (Celenza e cols., 1995):

1. O transporte de AIA de modo acrópeto (em direção à extremidade) no estelo é necessário para iniciar a divisão celular no periciclo.
2. O AIA é necessário para promover a divisão celular e manutenção da viabilidade das células durante o desenvolvimento das raízes laterais.

A auxina retarda o início da abscisão foliar

A perda das folhas, flores e frutos por uma planta é conhecida como **abscisão.** Esses órgãos desprendem-se da planta na **zona de abscisão**, que está localizada próxima à base do pecíolo. Na maioria dos vegetais, a abscisão foliar é precedida pela diferenciação de uma distinta camada de células, a **camada de abscisão**, na zona de abscisão. Durante a senescência foliar, as paredes das células da camada de abscisão são digeridas, o que as torna maleáveis e fracas. Eventualmente, a folha desprende-se da planta na zona de abscisão como resultado do estresse nas paredes celulares enfraquecidas.

Os níveis de auxina são altos nas folhas jovens, decrescendo de forma progressiva nas maduras e são relativamente baixos nas folhas em senescência, quando inicia o processo de abscisão foliar. O papel da auxina na abscisão foliar pode ser facilmente demonstrado pela excisão da lâmina de uma folha madura, deixando o pecíolo intacto no caule. Enquanto que a remoção da lâmina foliar acelera a formação da camada de abscisão no pecíolo, a aplicação de AIA em pasta de lanolina à superfície cortada impede a formação dessa camada (aplicação da pasta de lanolina sem AIA não evita a abscisão).

Estes resultados sugerem:

- A auxina transportada a partir da lâmina foliar impede a abscisão.
- A abscisão é desencadeada durante a senescência foliar, quando a auxina não está mais sendo produzida.

Entretanto, como será discutido no Capítulo 22, o etileno também apresenta papel crucial como um regulador positivo da abscisão.

(A) (B) Selvagem (C)

(D) (E) *alf-1* (F)

FIGURA 19.37 Morfologia de raiz de plântulas selvagens (A-C) e mutantes *alf1* de *Arabidopsis* (D-F) em meio sem hormônio. Observe a proliferação dos primórdios radiculares crescendo a partir do periciclo nas plântulas *alf1* (D e E) (Celenza e cols., 1995, cedidas por J. Celenza).

O transporte de auxina regula o desenvolvimento das gemas florais

O tratamento de plantas de *Arabidopsis* com o inibidor do transporte de auxina NPA provoca o desenvolvimento floral anormal, sugerindo que o transporte polar de auxina no meristema da inflorescência é necessário para o desenvolvimento floral normal. Em *Arabidopsis*, o mutante *pin1*, no qual falta o transportador de efluxo de auxina nos tecidos da parte aéreas, apresentam flores anormais, semelhantes àquelas das plantas tratadas com NPA (ver Figura 19.14A). Aparentemente, o desenvolvimento do meristema floral depende da auxina transportada dos tecidos subapicais para esse meristema. Na ausência do transportador de efluxo, o meristema apresenta falta de auxina e a filotaxia e o desenvolvimento floral normais são interrompidos (Kuhlemeier e Reinhardt, 2001).

A auxina promove o desenvolvimento do fruto

Várias evidências sugerem que a auxina está envolvida na regulação do desenvolvimento dos frutos. A auxina é produzida no pólen, no endosperma e no embrião de sementes em desenvolvimento e o estímulo inicial para o crescimento do fruto pode resultar da polinização.

A polinização bem-sucedida inicia o crescimento do rudimento seminal, o qual é conhecido como **estabelecimento do fruto** (do inglês, *fruit set*). Após a fertilização, o crescimento do fruto depende da auxina produzida nas sementes em desenvolvimento. O endosperma pode contribuir com auxina durante o estádio inicial do crescimento do fruto e o embrião em desenvolvimento pode ser a fonte principal de auxina durante os estágios seguintes.

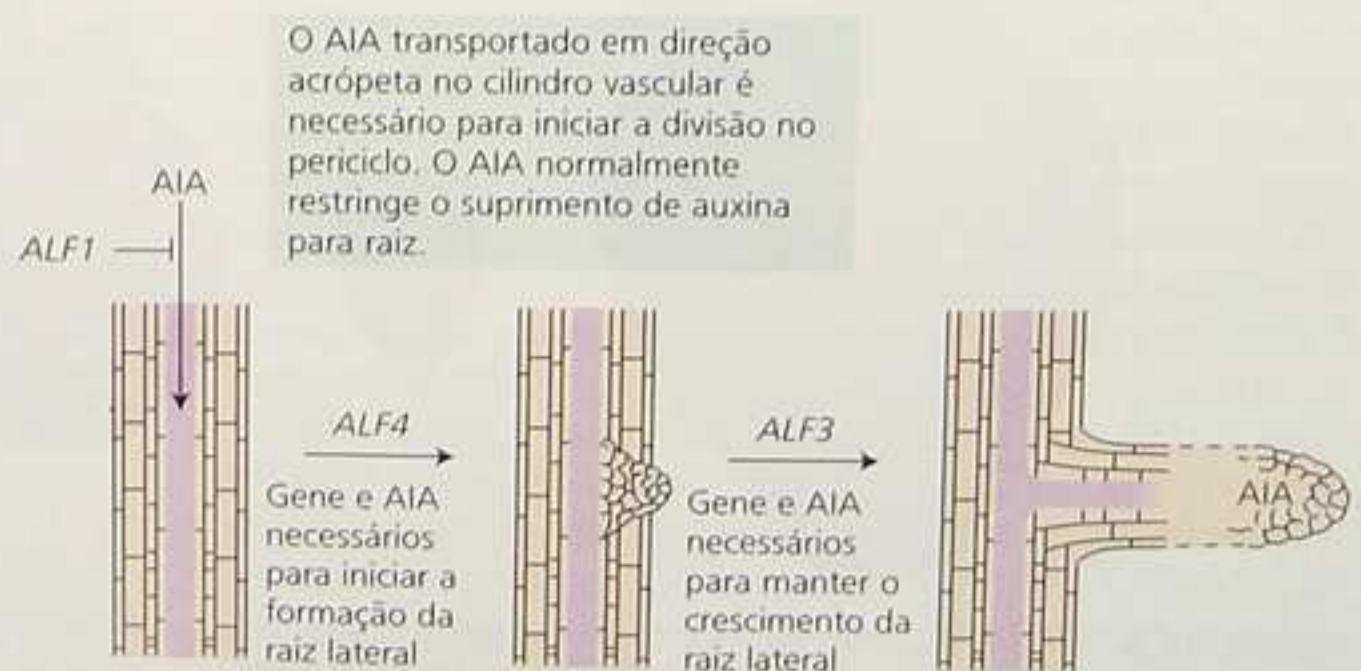



FIGURA 19.38 Modelo para formação de raízes laterais, baseado nos mutantes *alf* de *Arabidopsis* (Celenza e cols., 1995).

A Figura 19.39 mostra a influência da auxina produzida pelos aquênios do morango no crescimento do receptáculo.

A auxina induz a diferenciação vascular

Novos tecidos vasculares diferenciam-se diretamente abaixo das gemas em desenvolvimento e das folhas jovens em crescimento (ver Figura 19.5), enquanto a remoção das folhas jovens impede a diferenciação vascular (Aloni, 1995). A capacidade de uma gema apical em estimular a diferenciação vascular pode ser demonstrada pela cultura de tecidos. Quando a gema apical é enxertada em um grupo de células não-diferenciadas, ou *callus*, ocorre a diferenciação de xilema e floema abaixo do enxerto.

As quantidades relativas de xilema e de floema formadas são reguladas pela concentração de auxina: altas concentrações de auxina induzem a diferenciação de xilema e de floema, enquanto que somente floema diferencia-se em baixas concentrações. Da mesma forma, os experimentos com tecidos de caule indicaram que baixas concentrações de auxina promovem a diferenciação do floema, ao passo que altos níveis de AIA induzem xilema (Aloni, 1995).

A regeneração do tecido vascular após uma lesão também é controlada pela auxina produzida pela folha jovem diretamente acima do local danificado (Figura 19.40). A remoção da folha impede a regeneração do tecido vascular, ao passo que a aplicação de auxina pode substituir a folha no estímulo à regeneração.

A diferenciação vascular é polar e ocorre das folhas para as raízes. Em plantas perenes lenhosas, a auxina produzida pelas gemas em crescimento na primavera estimula a ativação do câmbio na direção basípeta. A nova camada de crescimento secundário inicia nos ramos menores e avança de modo descendente, em direção à extremidade da raiz.

Evidências adicionais do papel da auxina na diferenciação vascular foram obtidas de estudos nos quais a concentração de auxina foi manipulada pela transformação de plantas com genes de biossíntese desse hormônio, pelo uso de plasmídeo Ti de *Agrobacterium*. Quando um gene da biossíntese de auxina foi superexpressado em plantas de petúnia, o número de elementos traqueais do xilema aumentou. Por outro lado, quando o nível de AIA livre em plantas de tabaco foi diminuído pela transformação com um gene codificando uma enzima que conjuga o AIA ao aminoácido lisina, o número de elementos de vaso diminuiu e seus tamanhos aumentaram (Romano e cols., 1991). Assim, o nível de auxina livre parece regular o número de elementos de vaso, bem como as suas dimensões.

Em culturas de células de mesofilo de *Zinnia elegans*, a auxina é necessária para a diferenciação das células traqueais, mas as citocininas também participam desse processo, provavelmente pelo aumento da sensibilidade das células à auxina. Enquanto a auxina é produzida nas partes aéreas e transportada em direção à raiz, as citocininas são sintetizadas na extremidade da raiz e transportadas de modo ascendente para a parte aérea. Ambos os hormônios estão provavelmente envolvidos na regulação da ativação do câmbio e da diferenciação vascular (ver Capítulo 21).

As auxinas sintéticas apresentam vários usos comerciais

As auxinas vêm sendo utilizadas comercialmente na agricultura e na horticultura há mais de 50 anos. Os primeiros usos comerciais incluíam a prevenção da abscisão de frutos e folhas, a promoção de florescimento em abacaxi, a indução de frutos partenocárpicos, o raleio de frutos e o enraizamento de estacas para propagação vegetal. O enraizamento é aumentado se uma folha excisada ou uma estaca do caule é imersa em uma solução de auxina, o que aumenta a indução de raízes adventícias na extremidade cortada. Esta é a base dos compostos comerciais para enraizamento, os quais consistem, principalmente, de auxinas sintéticas misturadas a um talco inerte.

Em algumas espécies vegetais, os frutos sem sementes podem ser produzidos naturalmente ou podem ser induzidos por tratamento de flores não-polinizadas com auxina. A produção de tais frutos é denominada **partenocarpia.** Estimulando a formação de frutos partenocárpicos, a auxina atua principalmente para induzir

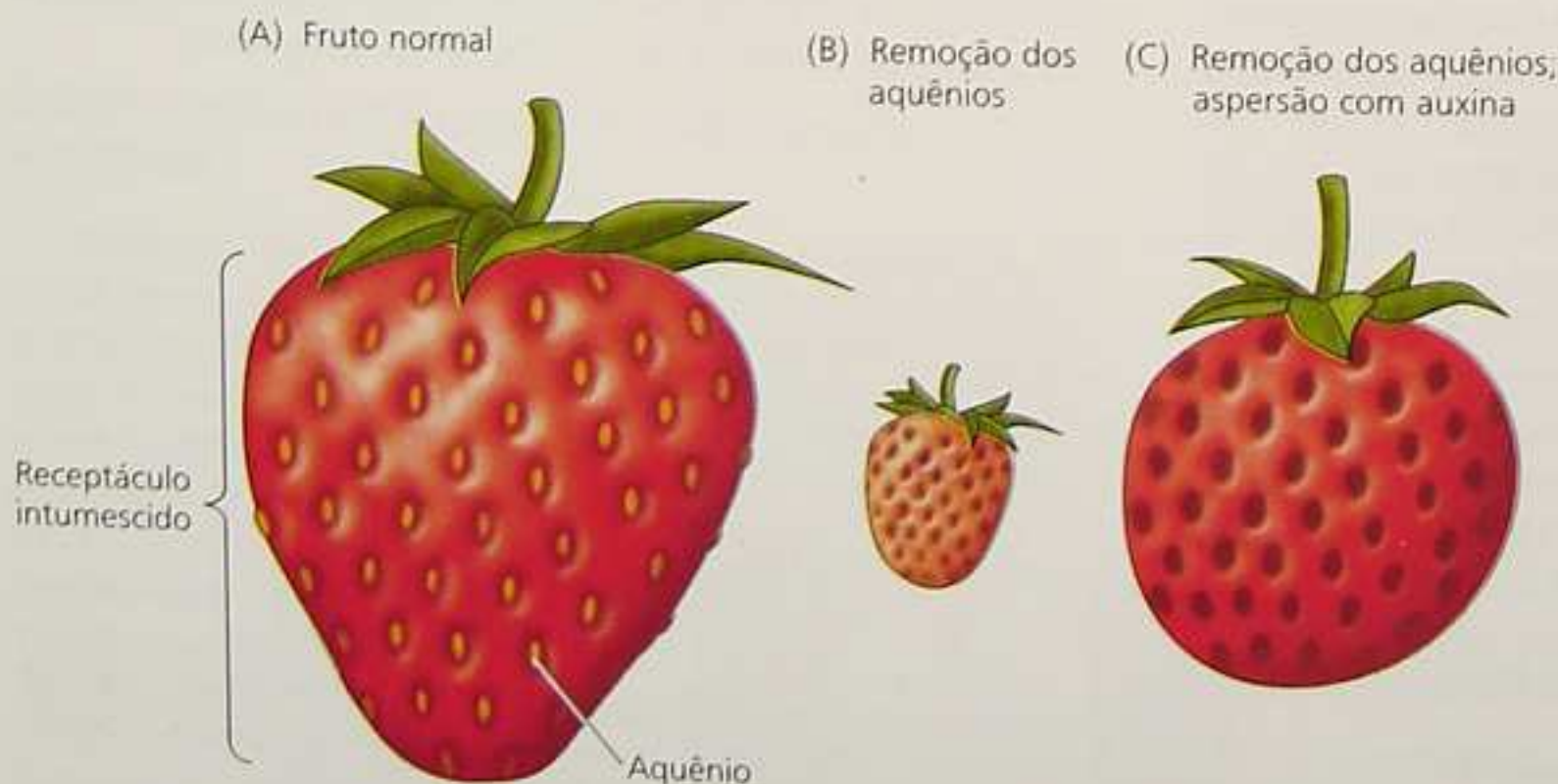



FIGURA 19.39 (A) O "fruto" do morango é na realidade o receptáculo intumescido, no qual o crescimento é regulado pela auxina produzida pelas "sementes", as quais são realmente os aquênios — frutos verdadeiros. (B) A aspersão com AIA de um receptáculo que não contenha aquênios restitui o crescimento e o desenvolvimento normais (A. Galston, 1994).

(A)

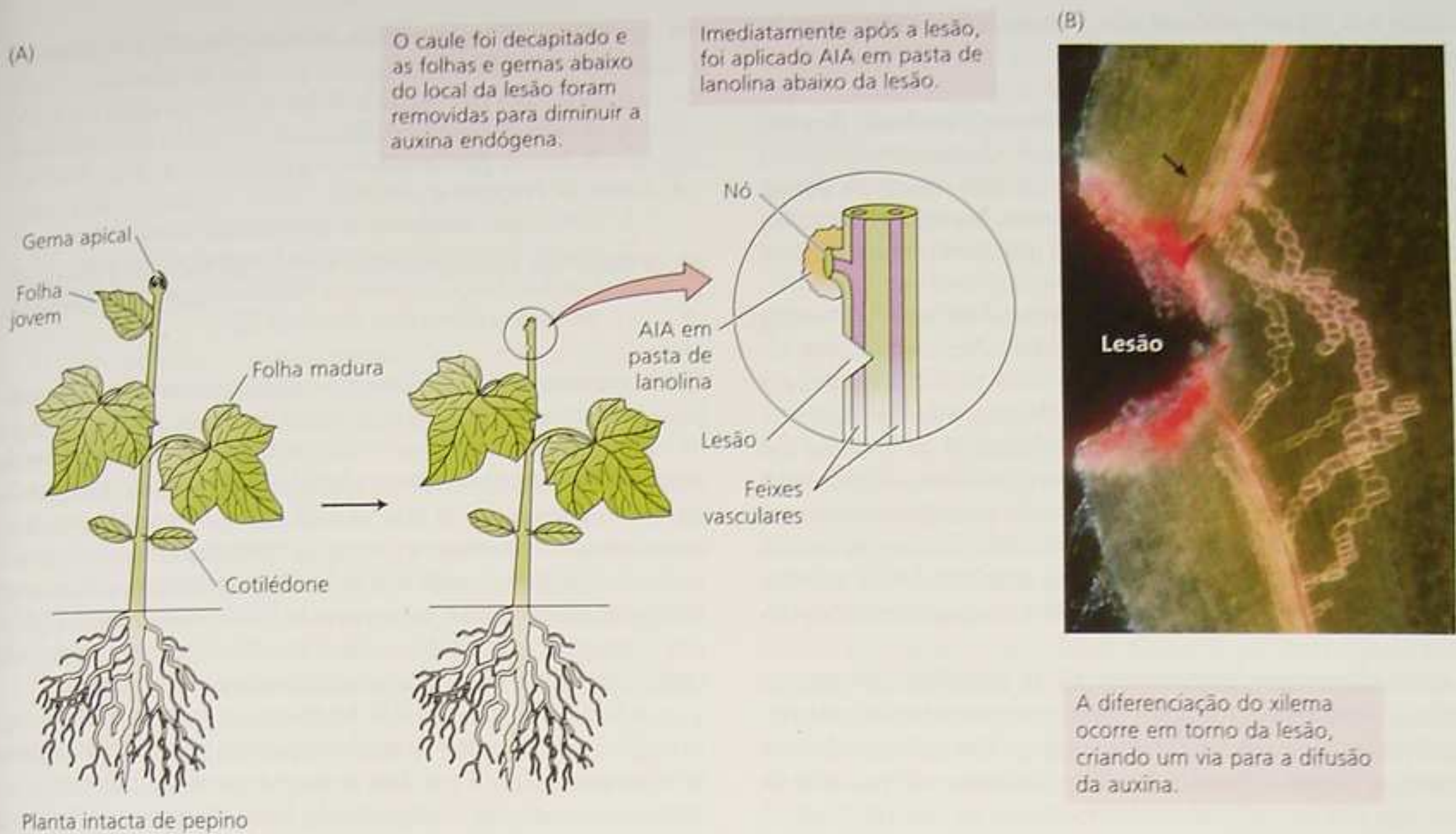



FIGURA 19.40 Regeneração do xilema induzida por AIA adjacente a um tecido danificado do caule de pepino (*Cucumis sativus*). (A) Método para realizar o experimento de regeneração de áreas danificadas. (B) Micrografia de fluorescência apresentando o tecido vascular em regeneração em torno da lesão (B, cedida por R. Aloni).

o estabelecimento do fruto, o qual, por sua vez, desencadeia a produção endógena de auxina por alguns dos tecidos do fruto para completar o processo de desenvolvimento.

O etileno também está envolvido no desenvolvimento do fruto e alguns efeitos da auxina na frutificação podem ser resultado da promoção da síntese de etileno. O controle do etileno na manipulação comercial de frutos será discutido no Capítulo 22.

Além dessas aplicações, as auxinas são utilizadas, hoje, como herbicidas. Os produtos químicos 2,4-D e dicamba (ver Figura 19.4) são provavelmente as auxinas sintéticas mais amplamente utilizadas. As auxinas sintéticas são bastante eficientes, pois não são metabolizadas pela planta tão rapidamente quanto o AIA. Visto que o milho e outras monocotiledôneas podem rapidamente inativar auxinas sintéticas por conjugação, essas auxinas são utilizadas pelos agricultores para o controle de dicotiledôneas invasoras, também chamadas de *invasoras de folha larga*, em culturas comerciais de cereais, sendo também utilizadas por jardineiros para o controle de invasoras como dente-de-leão e margaridas em gramados.

ROTAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL DE AUXINA

O objetivo fundamental da pesquisa sobre o mecanismo molecular da ação hormonal é reconstruir cada etapa da rota de transdução de sinal, a partir da ligação com o receptor até a resposta fisiológica. Nesta última seção deste capítulo, serão examinados os candidatos a receptores de auxina e, então, discutidas as rotas de sinalização que têm sido relacionadas à ação da auxina. Por último, será dispensada atenção à expressão gênica regulada pela auxina.

ABP1 funciona como um receptor de auxina

Além do seu possível papel direto na ativação da H^+-ATPase (já discutido), a proteína de ligação à auxina (ABP1) parece ter ação como receptor de auxina em outras rotas de transdução de sinal. Homólogos de ABP1 foram identificados em várias espécies de mono e dicotiledôneas (Venis e Napier, 1997). Nocautes do gene *ABP1* em *Arabidopsis* são letais e mutações menos severas resultam em alterações no desenvolvimento (Chen e cols., 2001). Estudos recentes indicam que, apesar de estar localizada principalmente no retículo endoplasmático (RE), uma pequena quantidade de ABP1 é secretada para a superfície externa da membrana plasmática, onde interage com a auxina, causando a expansão do protoplasma e o bombeamento de H^+ (Venis e cols., 1996; Steffens e cols., 2001).

No entanto, é pouco provável que a ABP1 sirva de intermediária em todas as rotas de resposta da auxina, pois a expressão de vários de genes de resposta à auxina não é afetada quando os protoplastos são incubados com anticorpos anti-ABP1. Ainda não está claro que função a ABP1 exerce no RE com respeito à transdução de sinal em resposta à auxina. Por último, ainda deve ser determinado se a ABP_{57}, a ABP solúvel do arroz, que ativa a H^+-ATPase (ver Figura 19.24), está envolvida na rota de transdução de sinal.

O cálcio e o pH intracelular são possíveis intermediários na sinalização

O cálcio apresenta função importante na transdução de sinal em animais e parece estar também envolvido na ação de certos hormônios vegetais. O papel do cálcio na ação da auxina parece ser muito complexo e, até este ponto, incerto. No entanto, algumas evidências experimentais demonstram que a auxina aumenta o nível de cálcio livre na célula.

As mudanças no pH citoplasmático também agem como um segundo mensageiro em animais e vegetais. Nestes, a auxina induz a diminuição do pH citosólico em cerca de 0,2 unidades em quatro minutos de aplicação. A causa desta queda no pH não é conhecida. Como o pH citosólico normalmente é cerca de 7,4 e o pH ótimo da H^+-ATPase da membrana plasmática, de 6,5, uma diminuição do pH citosólico de 0,2 unidades poderia provocar um aumento marcante na atividade dessa enzima. Tal decréscimo do pH poderia também ser responsável pelo aumento do cálcio intracelular induzido pela auxina, por promover a dissociação das formas ligadas.

As MAP quinases (ver **Capítulo 14 na Internet**), com ação na transdução de sinal por fosforilar proteínas em uma cascata de reações, ativando fatores de transcrição, também têm sido relacionadas às respostas à auxina. Quando as células de tabaco são privadas de auxina, elas têm seu ciclo celular interrompido no final das fases G_1 ou G_2; se a auxina é adicionada ao meio de cultura, o ciclo celular reinicia (Koens e cols., 1995) (para descrição do ciclo celular, ver Capítulo 1). A auxina parece exercer seu efeito primeiramente estimulando a síntese de uma proteína quinase dependente de ciclina (CDK): Cdc2 (*c*iclo de *d*ivisão *c*elular 2) (ver **Capítulo 14 na Internet**).

Os genes induzidos pela auxina estão divididos em duas classes: precoces e tardios

A ativação de um grupo restrito de fatores de transcrição é uma das importantes funções da(s) rota(s) de transdução de sinal iniciada(s) quando a auxina liga-se ao seu receptor. Tais fatores ativados entram no núcleo e promovem a expressão de genes específicos. Os genes dos quais a expressão é estimulada pela ativação de fatores de transcrição preexistentes são chamados de **genes de resposta primária** ou **genes precoces** (do inglês, *early genes*).

Essa definição implica que todas as proteínas necessárias para a indução da expressão dos genes precoces por auxina estão presentes nas células no momento de exposição ao hormônio; assim, a expressão dos genes precoces não pode ser bloqueada por inibidores da síntese de proteínas, como a cicloeximida. Como conseqüência, o tempo necessário para a expressão dos genes precoces pode ser bastante curto, variando de poucos minutos a algumas horas (Abel e Theologis, 1996).

De modo geral, os genes de resposta primária apresentam três funções principais: (1) Alguns deles codificam proteínas que regulam a transcrição de **genes de resposta secundária**, ou **genes tardios** (do inglês, *late genes*), necessários para respostas de longo prazo ao hormônio. Visto que os genes tardios necessitam de síntese protéica *de novo*, sua expressão pode ser bloqueada por inibidores da síntese de proteínas. (2) Outros genes precoces estão envolvidos na comunicação intercelular ou sinalização célula a célula. (3) Outro grupo de genes precoces está relacionado à adaptação ao estresse.

Cinco classes principais de genes precoces de resposta à auxina foram identificadas:

- Genes regulados por auxina, relacionados com o crescimento e desenvolvimento:
  1. A família gênica *AUX/AIA*.
  2. A família gênica *SAUR*.
  3. A família gênica *GH3*.
- Genes de resposta ao estresse
  1. Genes que codificam as glutationa S-transferases
  2. Genes que codificam a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) sintase, a enzima-chave na rota biossintética do etileno (ver Capítulo 22).

Genes precoces para o crescimento e desenvolvimento. Os membros da família de genes *AUX/AIA* codificam fatores de transcrição de curta duração, que agem como repressores ou ativadores da expressão dos genes tardios induzidos pela auxina. A expressão da maioria dos genes da família *AUX/AIA* é estimulada pela auxina em cinco a 60 minutos a partir da adição do hormônio. Todos os genes codificam polipeptídeos hidrofílicos pequenos, que apresentam motivos putativos de ligação de DNA, semelhantes àqueles dos repressores de bactérias. Eles também apresentam meia-vida curta (cerca de sete minutos), indicando rápida reciclagem.

A família de genes *SAUR* foi mencionada anteriormente neste capítulo, em relação aos tropismos. A auxina estimula a expressão dos genes *SAUR* em dois a cinco minutos de tratamento e a resposta é insensível à cicloeximida. Os cinco genes *SAUR* de soja estão agrupados, não apresentam íntrons e codificam polipeptídeos altamente similares de função desconhecida. Devido à rapidez da resposta, a expressão dos genes *SAUR* tem sido apontada como uma sonda útil para o transporte lateral de auxina durante o foto e o gravitropismo.

Os membros da família de genes precoces *GH3*, identificados em soja e *Arabidopsis*, são estimulados pela auxina em cinco minutos. Mutações em genes relacionados ao *GH3*, em *Arabidopsis*, resultam em nanismo (Nakazawa e cols., 2001) e parecem ter função nas respostas à auxina reguladas pela luz (Hsieh e cols., 2000). Visto que a expressão do gene *GH3* é um bom reflexo da presença de auxina endógena, um gene-repórter sintético baseado em *GH3*, conhecido como *DR5*, tem sido amplamente usado nos bioensaios com auxina (ver Figura 19.5 e **Tópico 19.12 na Internet**) (Ulmasov e cols., 1997).

Genes precoces para adaptação a estresses. Conforme já citado neste capítulo, a auxina está envolvida nas respostas ao estresse, tal como lesão. Vários genes que codificam as glutationa S-transferases (GSTs), uma classe de proteínas ativadas por várias condições de estresse, são induzidos por concentrações elevadas de auxina. Da mesma forma, a ACC sintase, também induzida pelo estresse e etapa limitante na biossíntese de etileno (ver Capítulo 22), é induzida por altos níveis de auxina.

Para serem induzidos, os promotores dos genes precoces de auxinas devem conter elementos de resposta que se ligam a fatores de transcrição, os quais se tornam ativados na presença de auxina. Um número restrito desses elementos de resposta parece ser organizado de modo combinatório nos promotores de vários genes induzidos por auxina.

Os domínios de resposta à auxina são estruturas compostas

Um **elemento de resposta à auxina (AuxRE)** conservado nos promotores dos genes precoces de auxina, como o *GH3*, está nor-

malmente combinado com outros elementos de resposta para formar os **domínios de resposta à auxina (AuxRDs)**. Por exemplo, o promotor do gene *GH3* de soja é composto de três AuxRDs ativos independentes (cada um contendo múltiplos AuxREs), que contribuem de modo aditivo para a forte capacidade de indução do promotor pela auxina.

Os genes precoces da auxina são regulados por fatores de resposta à auxina

Conforme visto, os genes precoces de auxina são, por definição, insensíveis a inibidores da síntese protéica, como a cicloeximida. Em vez de serem inibidos, a expressão de muitos genes é estimulada por esse inibidor.

O estímulo da expressão gênica por cicloeximida é obtido tanto pela ativação da transcrição quanto pela estabilização do mRNA. A ativação transcricional de um gene por inibidores da síntese protéica via de regra indica que o gene está sendo reprimido por uma proteína repressora de meia-vida curta ou por uma rota de regulação que envolve uma proteína com alta taxa de reciclagem.

Uma família de **fatores de resposta à auxina (ARFs)** age como ativadores de transcrição por ligar-se aos elementos de resposta à auxina TGTCTC, os quais estão presentes nos promotores dos genes *GH3* e outros genes precoces de resposta a este hormônio. Mutações nos genes ARF resultam em defeitos severos no desenvolvimento. Para se ligarem estavelmente aos AuxRE, os ARFs devem formar dímeros. Foi afirmado que os dímeros ARF promovem a transcrição por se ligarem a dois AuxREs organizados em um palíndromo (Ulmasov e cols., 1997).

Estudos recentes indicam que as proteínas codificadas pela família de genes *AUX/AIA* (a própria uma das famílias de genes precoces de resposta à auxina) podem inibir a transcrição dos genes precoces de resposta, por formar heterodímeros inativos com os ARFs. Esses heterodímeros inativos podem atuar inibindo a ligação ARF-AuxRE, bloqueando, assim, a ativação ou a repressão do gene. As proteínas AUX/AIA podem, então, agir como inibidores de ARFs.

Atualmente acredita-se que a auxina induz a transcrição de genes precoces de resposta por promover a degradação proteolítica das proteínas inibidoras AUX/AIA, de modo que os dímeros ativos possam ser formados. O mecanismo preciso pelo qual a auxina causa a reciclagem da AUX/AIA é desconhecido, embora se saiba que envolve a ubiquitinação pela ubiquitina ligase e a proteólise pelo complexo proteassoma 26S (ver **Capítulo 14 na Internet**) (Gray e cols., 2001; Zenser e cols., 2001). Observe que uma via de *feedback* negativo é introduzido na rota em virtude de que uma das famílias de genes ativadas pela auxina é a *AUX/AIA*, a qual inibe a resposta.

Um modelo para a regulação da auxina por genes precoces de resposta baseado nas descobertas descritas aqui é ilustrado na Figura 19.41.

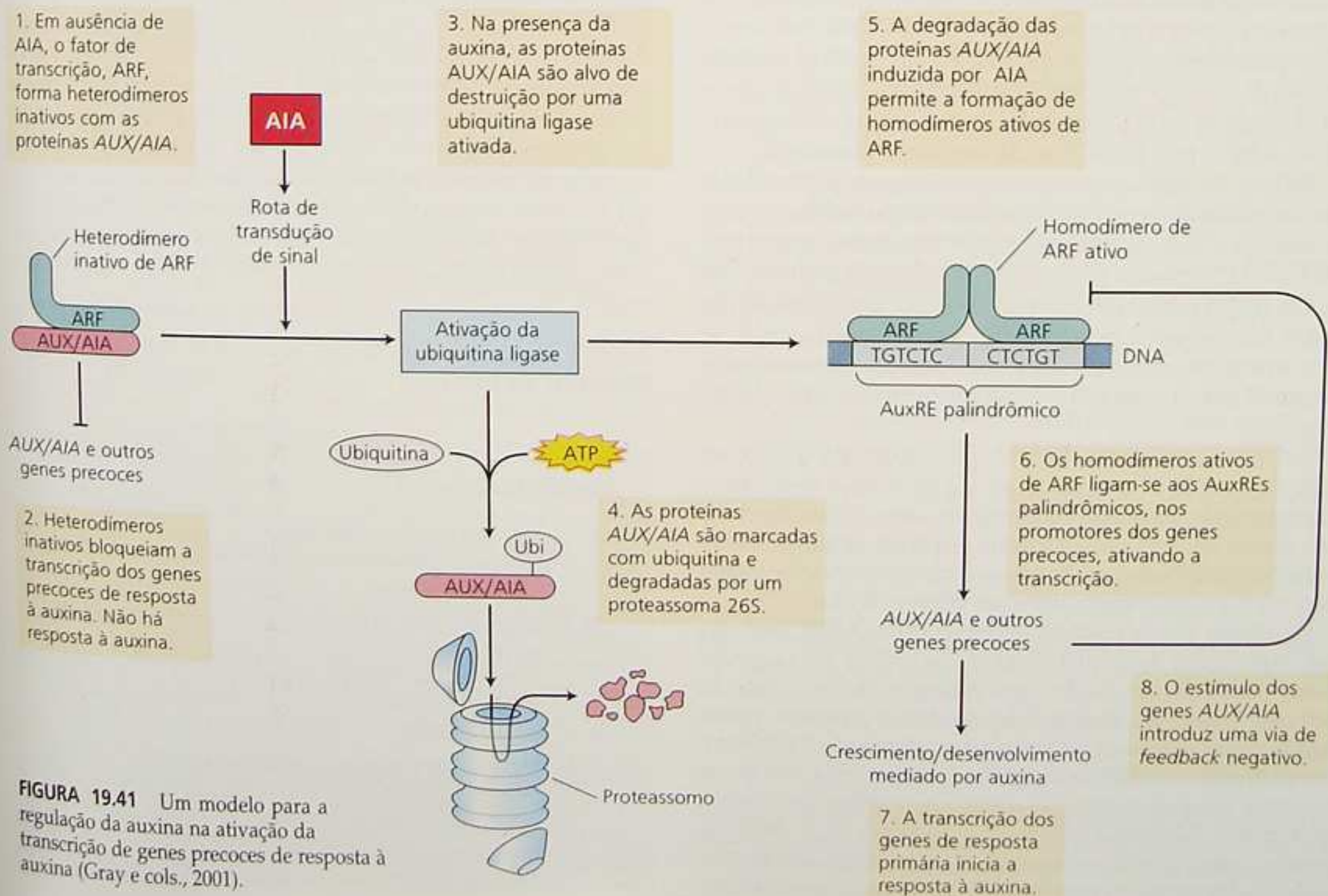



FIGURA 19.41 Um modelo para a regulação da auxina na ativação da transcrição de genes precoces de resposta à auxina (Gray e cols., 2001).

RESUMO

A auxina foi o primeiro hormônio descoberto em plantas e é um, dentre uma vasta gama, dos agentes químicos sinalizadores que regulam o desenvolvimento vegetal. A auxina mais comum de ocorrência natural é o ácido indol-3-acético (AIA). Uma das principais funções da auxina nos vegetais superiores é a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleóptilos. Baixos níveis de auxina são também necessários para o alongamento da raiz, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão.

A medição precisa da quantidade de auxina em tecidos vegetais é crítica para o entendimento da função desse hormônio na fisiologia vegetal. Os bioensaios pioneiros baseados em coleóptilos foram substituídos por técnicas mais acuradas, incluindo métodos físico-químicos e imunoensaios.

A regulação do crescimento em vegetais pode depender em parte da auxina livre presente nas células, tecidos e órgãos vegetais. Há dois *pools* principais de auxina na célula: o citosol e os cloroplastos. Os níveis de auxina livre podem ser regulados por vários fatores, incluindo a síntese e a degradação de AIA conjugado, metabolismo do AIA, compartimentalização e transporte polar da auxina. Várias rotas foram relacionadas à biossíntese de AIA, incluindo as vias dependente e independente do triptofano, assim como diversas rotas de degradação do AIA foram identificadas.

O AIA é principalmente sintetizado na gema apical e transportado de modo polar para a raiz. O transporte polar ocorre preferencialmente nas células do parênquima associadas ao tecido vascular. O transporte polar da auxina pode ser dividido em dois processos principais: o influxo e o efluxo de AIA. De acordo com o modelo quimiosmótico para o transporte polar, há dois modelos de influxo de AIA: por um transporte passivo da forma não-dissociada dependente do pH, ou por um mecanismo de co-transporte H^+ ativo dirigido pela H^+-ATPase da membrana plasmática.

O efluxo de auxina ocorre principalmente nas extremidades basais das células de transporte através de transportadores de efluxo de ânions e é dirigida pelo potencial de membrana gerado pela H^+-ATPase da membrana plasmática. Os inibidores do transporte de auxina (ITAs) podem interromper o transporte diretamente por competir com a auxina pelo poro do canal de efluxo ou por se ligarem a proteínas estruturais ou reguladoras associadas ao canal de efluxo. A auxina pode ser transportada de modo não polar no floema.

O alongamento celular induzido pela auxina inicia após um *lag time* de cerca de 10 minutos. A auxina promove o crescimento por alongamento, sobretudo por aumentar a capacidade de extensão da parede celular. O afrouxamento da parede celular induzido por auxina necessita de um contínuo aporte metabólico e é mimetizado, em parte, pelo tratamento com tampões ácidos.

De acordo com a hipótese do crescimento ácido, uma das ações importantes da auxina é induzir as células a transportar prótons para a parede celular, pelo estímulo da H^+-ATPase da membrana plasmática. Dois mecanismos foram propostos para a extrusão de prótons induzida por auxina: ativação direta da bomba de prótons e aumento da síntese da H^+-ATPase da membrana plasmática. A capacidade que os prótons apresentam de causar o afrouxamento da parede celular é mediada por uma classe de proteínas denominadas expansinas. As expansinas afrouxam a parede celular por quebrar as ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos da parede. Além da extrusão de prótons, o crescimento em longo prazo induzido por auxina envolve a absorção de solutos e a síntese e deposição de polissacarídeos e proteínas necessários para manter a capacidade de indução ácida do afrouxamento da parede.

A promoção do crescimento em caules e coleóptilos e a inibição do crescimento nas raízes são os efeitos fisiológicos mais estudados da auxina. O crescimento diferencial desses órgãos promovido pela auxina é responsável pelo estímulo direcional (p. ex., luz, gravidade), denominados tropismos. De acordo com o modelo Cholodny-Went, a auxina é transportada lateralmente para o lado sombreado durante o fototropismo e para a metade inferior durante o gravitropismo. Os estatólitos (amiloplastos com grãos de amido) nos estatócitos estão envolvidos na percepção normal da gravidade, mas não são absolutamente necessários.

Além das suas funções no crescimento e nos tropismos, a auxina participa na regulação da dominância apical, da iniciação das raízes laterais, da abscisão foliar, da diferenciação vascular, da formação de gemas florais e do desenvolvimento do fruto. As aplicações comerciais da auxina incluem compostos para enraizamento e herbicidas.

A proteína solúvel ABP1 de ligação à auxina é um possível receptor da auxina. A ABP1 está localizada principalmente no lume do retículo endoplasmático. Os estudos das vias de transdução de sinal envolvidas na ação da auxina envolvem outros intermediários de sinalização, tais como cálcio, pH intracelular e quinases na divisão celular induzida por auxina.

Os genes induzidos pela auxina são classificados em duas categorias: precoces e tardios. A indução de genes precoces pela auxina não necessita da síntese de proteínas e é insensível aos inibidores de síntese protéica. Os genes precoces são distribuídos em três classes funcionais: a expressão de genes tardios (genes de respostas secundárias), a adaptação a estresse e a sinalização intercelular. Os domínios de resposta à auxina dos promotores dos genes precoces apresentam uma estrutura composta, na qual um elemento de resposta induzido por auxina está combinado com um elemento de resposta constitutiva. Os genes induzidos por auxina podem ter sua expressão diminuída por proteínas repressoras, que são degradadas através de uma rota de ativação da ubiquitina.

Material da Internet

Tópicos da Internet

19.1 Auxinas sintéticas adicionais
Auxinas sintéticas biologicamente ativas apresentam estruturas diversas.

19.2 Requerimentos estruturais para a atividade da auxina
As comparações entre vários de compostos que possuem atividade auxínica têm revelado características comuns em nível molecular, as quais são essenciais para a atividade biológica.

19.3 Medidas de auxina por radioimunoensaio
O radioimunoensaio (RIE) permite a determinação dos níveis fisiológicos (10^{-9} g = 1 ng) de AIA nos tecidos vegetais.

19.4 **Evidências da biossíntese de AIA independente de triptofano**
É fornecida uma evidência experimental adicional para a biossíntese de AIA independente do triptofano.

19.5 **Os múltiplos fatores que regulam os níveis estáveis de AIA**
O nível estável do AIA livre no citoplasma é determinado por vários processos interconectados, incluindo a síntese e a degradação, a conjugação, a compartimentalização e o transporte.

19.6 **O mecanismo da ativação fusicocina da H^+-ATPase da membrana plasmática.**
A fusicocina, uma fitotoxina produzida pelo fungo *Fusicoccum amygdale*, causa a hiperpolarização e a extrusão de prótons em praticamente todos os tecidos vegetais, além de agir como uma "superauxina" nos ensaios de alongamento.

19.7 **A resposta do fototropismo à fluência**
É descrito o efeito da fluência no fototropismo e explicado o modelo do fenômeno.

19.8 **A expressão diferencial do gene SAUR durante o gravitropismo**
A expressão do gene SAUR é usada para detectar o gradiente lateral de auxina durante o gravitropismo.

19.9 **A percepção da gravidade sem os estatólitos em *Chara***
A alga de água doce e de células gigantes, *Chara*, curva-se em resposta à gravidade sem qualquer estatólito aparente.

19.10 **O papel da citocinina na dominância apical**
Em *Pseudotsuga menziesii* há uma correlação entre os níveis de citocininas e o crescimento das gemas axilares.

19.11 **O papel do ABA na dominância apical**
Em *Elytrigia repens* o crescimento da gema axilar está relacionado com a redução nos níveis de ABA.

19.12 **As medições do AIA são facilitadas pelas construções-repórter baseadas no gene *GH3*.**
Visto que a expressão do *GH3* é um reflexo da presença de auxina endógena, um gene-repórter com base em *GH3*, conhecido com *DR5*, é amplamente utilizado nos bioensaios de auxina.

19.13 **O efeito da auxina na degradação das proteínas AUX/AIA mediada por ubiquitina**
Discute um modelo para a degradação das proteínas AUX/AIA regulada por auxina.

Ensaios da Internet

19.1 **Brassinoesteróides: Uma nova classe de hormônios esteróides vegetais**
Os brassinoesteróides têm sido relacionados a uma ampla gama de fenômenos do desenvolvimento vegetal, incluindo alongamento de caule, inibição do crescimento de raiz e biossíntese de etileno.

19.2 **Explorando a base celular do transporte polar da auxina**
A evidência experimental indica que o transporte polar do hormônio vegetal auxina é regulado em nível celular. Isto implica que as proteínas envolvidas no transporte de auxina precisam estar distribuídas assimetricamente na membrana plasmática. Como essas proteínas de transporte tem seu destino determinado é assunto das pesquisas em andamento.

19.3 **Fototropismo: da fotopercepção às mudanças na expressão gênica dependente da auxina**
O assunto deste ensaio é a maneira como a fotopercepção pelas fototropinas está associada à sinalização da auxina.

Referências bibliográficas

Abel, S., Ballas, N., Wong, L-M., and Theologis, A. (1996) DNA elements responsive to auxin. *Bioessays* 18: 647-654.

Aloni, R. (2001) Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *J. Plant Growth Regul.* 20: 22-34.

Aloni, R. (1995) The induction of vascular tissue by auxin and cytokinin. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth Development*, 2nd ed., P. J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 531-546.

Aloni, R., Schwalm, K., Langhans, M., and Ullrich, C. I. (2002) Gradual shifts in sites and levels of auxin synthesis during leaf primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. Manuscript submitted for publication.

Bartel, B. (1997) Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 51-66.

Bennett, M. J., Marchand, A., Green, H. G., May S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schultz, B., and Feldmann, K. A. (1996) *Arabidopsis* AUX1 gene: A permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948-950.

Bernasconi, P. (1996) Effect of synthetic and natural protein tyrosine kinase inhibitors on auxin efflux in zucchini *(Cucurbita pepo)* hypocotyls. *Physiol. Plant.* 96: 205-210.

Briggs, W. R., Beck, C. F., Cashmore, A. R., Christie, J. M., Hughes, J., Jarillo, J. A., Kagawa, T., Kanegae, H., Liscum, E., Nagatani, A., Okada, K., Salomon, M., Ruediger, W., Sakai, T., Takano, M., Wada, M., and Watson, J. C. (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell* 13: 993-997.

Brown, D. E., Rashotte, A. M, Murphy A. S., Normanly J., Tague, B.W., Peer W. A., Taiz, L., and Muday, G. K. (2001) Flavonoids act as negative regulators of auxin transport *in vivo* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 524-535.

Celenza, J. L., Grisafi, P L., and Fink, G. R. (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9: 2131-2142.

Chen, J. G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R., and Jones, A. M. (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev.* 15: 902-911.

Chen, R., Hilson, P., Sedbrook, J., Rosen, E., Caspar, T., and Masson, P. H. (1998) The *Arabidopsis thaliana* AGRAVITROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15112-15117.

Cleland, R. E. (1995) Auxin and cell elongation. In *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, 2nd ed., P. J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 214-227.

Fasano, J. M., Swanson, S. J., Blancaflor, E. B., Dowd, P E., Kao, T. H., and Gilroy, S. (2001) Changes in root cap pH are required for the gravity response of the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 13: 907-921.

Friml, J., Wlsniewska, J., Benkova, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809.

Fujihira, K., Kurata, T., Watahiki, M. K., Karahara, I., and Yamamoto, K. T. (2000) An agravitropic mutant of Arabidopsis, *endodermal-amyloplast less 1*, that lacks amyloplasts in hypocotyl endodermal cell layer. *Plant Cell Physiol.* 41: 1193-1199.

Galston, A. (1994) *Life Processes of Plants*. Scientific American Library New York.

Garbers, C., DeLong, A., Deruere, J., Bernasconi, P., and Soll, D. (1996) A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit affects auxin transport in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 15: 2115-2124.

Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jurgens, G., and Palme, K. (2001) Auxin transport inhibitors block PINT cycling and vesicle trafficking. *Nature.* 413: 425-428.

Gocal, G. F. W., Pharis, R. P., Yeung, E. C., and Pearce, D. (1991) Changes after decapitation in concentrations of IAA and abscisic acid in the larger axillary bud of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Tender Green. *Plant Physiol.* 95: 344-350.

Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., and Estelle, M. (2001) Auxin regulates the SCFTIRl-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.

Hasenstein, K. H., and Evans, M. L. (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays. Plant Physiol.* 86:890-894.

Hsieh, H. L., Okamoto, H, Wang, M. L., Ang, L. H., Matsui, M., Goodman, H., Deng, XW. (2000) *FIN219,* an Auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COPT in light control of *Arabidopsis* development. *Genes Dev.* 14: 1958-1970.

Iino, M., and Briggs, W. R. (1984) Growth distribution during first positive phototropic curvature of maize coleoptiles. *Plant Cell Environ.* 7: 97-104.

Jacobs, M., and Gilbert, S. F. (1983) Basal localization of the presumptive auxin carrier in pea stem cells. *Science* 220: 1297-1300.

Jacobs, M., and Rubery, P. H. (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349.

Jacobs, M, and Ray, P M. (1976) Rapid auxin-induced decrease in the free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. *Plant Physiol.* 58: 203-209.

Kim, Y-S., Min, J.-K., Kim, D., and Jung, J. (2001) A soluble auxin binding protein, ABP57. *J. Biol. Chem.* 276: 10730-10736.

Koens, K. B., Nicoloso, F. T., Harteveld, M., Libbenga, K. R., and Kijne, J. W. (1995) Auxin starvation results in G2-arrest in suspension-cultured tobacco cells. *J. Plant Physiol.* 147: 391-396.

Kuhlemeier, C. and Reinhardt, D. (2001) Auxin and Phyllotaxis. *Trends in Plant Science.* 6: 187-189.

Langridge, W. H. R., Fitzgerald, K. J., Koncz, C., Schell, J., and Szalay, A. A. (1989) Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase genes is regulated by plant growth hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3219-3223.

Ljung, K., Bhalerao, R. P, and Sandberg, G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant* J. 29: 465-474.

Lomax, T. L. (1986) Active auxin uptake by specific plasma membrane carriers. In *Plant Growth Substances,* M. Bopp, ed., Springer, Berlin, pp. 209-213.

Marchant, A., Kargul, J., May, S. T., Muller, P, Delbarre, A., PerrotRechenmann, C., and Bennet, M. J. (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO* J. 18: 2066-2073.

McClure, B. A., and Guilfoyle, T. (1989) Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91-93.

Mulkey T. I., Kuzmanoff, K. M., and Evans, M. L. (1981) Correlations between proton-efflux and growth patterns during geotropism and phototropism in maize and sunflower. *Planta* 152: 239-241.

Muller, A., Guan, C., Galweiler, L., Taenzler, P., Huijser, P., Marchant, A., Parry, G., Bennett, M., Wisman, E., and Palme, K. (1998) AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.* 17: 6903-6911.

Murphy A. S., Peer W. A., and Taiz, L. (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* 211: 315-324.

Nakazawa, M., Yabe, N., Ishikawa, T., Yamamoto, Y Y. Yoshizumi, T., Hasunuma, K., Matsui, M. (2001) *DFLI,* an auxin-responsive *GH3* gene homologue, negatively regulates shoot cell elongation and lateral root formation, and positively regulates the light response of hypocotyls length. *Plant J.* 25: 213-221.

Nonhebel, M., Cooney, T. P. and Simpson, R. (1993) The route, control and compartmentation of auxin synthesis. *Aust J. Plant Physiol.* 20: 527-539.

Normanly J. P, Slovin, J., and Cohen, J. (1995) Rethinking auxin biosynthesis and metabolism. *Plant Physiol.* 107: 323-329.

Palme, K., and Gdlweiler, L. (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 375-381.

Parry G., Delbarre, A., Marchant, A., Swarup, R., Napier, R., Perrot-Rechenmann, C., Bennett, M. J. (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation auxl. *Plant J.* 25: 399-406.

Peer, W. A., Brown, D., Taiz, L., Muday G. K., and Murphy A. S. (2001) Flavonol accumulation patterns correlate with developmental phenotypes of transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana. Plant Physiol.* 126: 536-548.

Peltier, J.-B., and Rossignol, M. (1996) Auxin-induced differential sensitivity of the H+-ATPase in plasma membrane subfractions from tobacco cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219: 492-496.

Romano, C. P., Hein, M. B., and Klee, H. J. (1991) Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastanoi. Genes Dev.* 5: 438-446.

Schmidt, R. C., Muller, A., Hain, R., Bartling, D., and Weiler, E. W. (1996) Transgenic tobacco plants expressing the *Arabidopsis thaliana* nitrilase II enzyme. *Plant J.* 9: 683-691.

Shaw, S., and Wilkins, M. B. (1973) The source and lateral transport of growth inhibitors in geotropically stimulated roots of *Zea mays* and *Pisum sativum. Planta* 109: 11-26.

Sievers, A., Buchen, B., and Hodick, D. (1996) Gravity sensing in tip-growing cells. *Trends Plant Sci.* 1: 273-279.

Sitbon, F., Edlund, A., Gardestrom, P., Olsson, O., and Sandberg, G. (1993) Compartmentation of indole-3-acetic acid metabolism in protoplasts isolated from leaves of wild-type and IAAoverproducing transgenic tobacco plants. *Planta* 191: 274-279.

Steffens, B., Feckler, C., Palme, K., Christian, M., Bottger, M., and Luethen, H. (2001) The auxin signal for protoplast swelling is perceived by extracellular ABPl. *Plant J.* 27: 591.

Swarup, R., Frixnl, J., Marchant, A., Ljung, K., Sandberg, G., Palme, K., and Bennett, M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648-2653.

Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell.* 9:1963-1971.

Utsuno, K., Shikanai, T., Yamada, Y., and Hashimoto, T. (1998) AGR, an AGRAVITROPIC locus of *Arabidopsis thaliana,* encodes a novel membrane protein family member. *Plant Cell Physiol.* 39:1111-1118.

Venis, M. A., and Napier, R. M. (1997) Auxin perception and signal transduction. In *Signal Transduction in Plants,* P Aducci, ed., Birkhduser, Basel, Switzerland, pp. 45-63.

Venis, M. A., Napier, R. M., Oliver, S. (1996) Molecular analysis of auxin-specific signal transduction. *Plant Growth Regulation.* 18: 1-6.

Volkmann, D., and Sievers, A. (1979) Graviperception in multicellular organs. In *Encyclopedia of Plant Physiology,* New Series, Vol. 7, W. Haupt and M. E. Feinleib, eds., Springer, Berlin, pp. 573-600.

Wright, A. D., Sampson, M. B., Neuffer, M. G., Michalczuk, L. P., Slovin, J., and Cohen, J. (1991) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science* 254: 998-1000.

Yoder, T. L., Zheng, H.-Q., Todd, P., and Staehelin, L. A. (2001) Amyloplast sedimentation dynamics in maize columella cells support a new model for the gravity-sensing apparatus of roots. *Plant Physiol.* 125: 1045-1060.

Young, L. M., and Evans, M. L. (1994) Calcium-dependent asymmetric movement of 3H-indole-3-acetic acid across gravistimulated isolated root caps of maize. *Plant Growth Regul.* 14: 235-242.

Young, L. M., and Evans, M. L. (1996) Patterns of auxin and abscisic acid movement in the tips of gravistimulated primary roots of maize. *Plant Growth Regul.* 20: 253-258.

Young, L. M., Evans, M. L., and Hertel, R. (1990) Correlations between gravitropic curvature and auxin movement across gravistimulated roots of *Zea mays. Plant Physiol.* 92: 792-796.

Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., and Callis, J. (2001) Auxin modulates the degradation rate of AUX/IAA proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11795-11800.

Zheng, H. Q., and Staehelin, L. A. (2001) Nodal endoplasmic reticulum, a specialized form of endoplasmic reticulum found in gravity-sensing root tip columella cells. *Plant Physiol.* 125: 252-265.

Capítulo

20 Giberelinas: reguladores da altura dos vegetais

POR QUASE 30 ANOS após a descoberta da auxina, em 1927, e mais de duas décadas depois da elucidação de sua estrutura como ácido indol-3-acético, pesquisadores ocidentais dedicados à área vegetal tentaram atribuir à auxina a regulação de todos os fenômenos do desenvolvimento dos vegetais. Entretanto, como será visto neste e nos capítulos subseqüentes, o crescimento e o desenvolvimento vegetais são processos regulados por vários tipos diferentes de hormônios que agem individualmente ou em conjunto.

Na década de 1950, foi caracterizado um segundo grupo de hormônios, as giberelinas (GAs), as quais constituem um grande grupo de compostos relacionados (são conhecidos mais de 125) que, ao contrário das auxinas, são definidos mais por sua estrutura química do que por sua atividade biológica. As giberelinas são freqüentemente associadas à promoção do crescimento do caule e a aplicação desses hormônios à plantas intactas pode induzir aumentos significativos nas suas alturas. Conforme será visto, contudo, as giberelinas desempenham importantes funções em vários fenômenos fisiológicos.

A biossíntese das giberelinas está sob um estrito controle genético, tanto de desenvolvimento quanto ambiental, sendo isolados e muitos mutantes deficientes em giberelina. Os alelos alto/anão das ervilhas estudadas por Mendel constituem exemplos famosos. Tais mutantes têm sido úteis na elucidação das complexas rotas de biossíntese de giberelinas.

Este capítulo começa descrevendo a descoberta, a estrutura química e a função das giberelinas na regulação de vários processos fisiológicos, incluindo a germinação de sementes, a mobilização das reservas do endosperma, o crescimento da parte aérea, o florescimento, o desenvolvimento floral e o estabelecimento do fruto. Após, serão examinadas, então, a biossíntese das giberelinas e a identificação das formas ativas do hormônio.

Recentemente, a aplicação de abordagens genético-moleculares tem levado a um considerável progresso no entendimento do mecanismo da ação da giberelina em nível molecular. Tais avanços serão discutidos no final do capítulo.

A DESCOBERTA DAS GIBERELINAS

Embora as giberelinas não tenham se tornado conhecidas pelos cientistas americanos e britânicos antes de 1950, elas haviam sido descobertas anos antes pelos cientistas japoneses. Os agricultores da Ásia, plantadores de arroz, conheciam uma doença que fazia com que as plantas de arroz crescessem excepcionalmente, mas que suprimia a produção de sementes. No Japão, essa doença era chamada de "planta-boba" ou *bakanae*.

Os fitopatologistas, ao investigarem essa doença, descobriram que a altura dessas plantas era induzida por um composto secretado por um fungo, que infectava o vegetal. Este composto foi isolado a partir de filtrados das culturas de fungo e chamado de *giberelina*, em alusão ao nome do fungo, *Gibberella fujikuroi*.

Nos anos 1930, os cientistas japoneses tiveram sucesso na obtenção de cristais impuros de dois compostos fúngicos com atividade no crescimento, os quais foram denominados *giberelina A* e *B*, mas, devido às barreiras de comunicação e à II Guerra Mundial, a informação não chegou ao Ocidente. Somente após a metade de 1950, dois grupos — um na estação experimental do Imperial Chemical Industries (ICI), em Welyn, na Grã-Bretanha, e outro no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Peoria, Illinois — obtiveram sucesso na elucidação da estrutura do material que haviam purificado a partir dos filtrados das culturas de fungos, ao qual denominaram *ácido giberélico*.

Ácido giberélico (GA_3)

Quase ao mesmo tempo, cientistas da Universidade de Tóquio isolaram três giberelinas a partir da giberelina A original e as chamaram de giberelina A_1, giberelina A_2 e giberelina A_3. A giberelina A_3 e o ácido giberélico eram, comprovadamente, idênticos.

Tornou-se evidente que existia uma família inteira de giberelinas e que em cada cultura de fungo predominavam giberelinas diferentes, embora o ácido giberélico fosse sempre o principal componente. Como será visto, a característica estrutural que todas as giberelinas apresentam em comum e que as define como uma família de moléculas é serem derivadas de uma estrutura em anel *ent*-caureno.

ent-Caureno

Como o ácido giberélico tornou-se disponível, os fisiologistas iniciaram os testes com esta molécula em uma grande variedade de plantas. Respostas espetaculares foram obtidas quanto ao crescimento por alongamento de plantas anãs ou em rosetas, particularmente em ervilhas (*Pisum sativum*) geneticamente anãs, milho anão (*Zea mays*) e muitas plantas em roseta.

Por outro lado, as plantas que eram geneticamente muito altas não apresentavam resposta de crescimento adicional com aplicação de giberelina. Mais recentemente, experimentos com plantas anãs de ervilha e de milho confirmaram que o crescimento natural dos vegetais por alongamento é regulado por giberelinas, conforme será descrito mais tarde.

Visto que a aplicação de giberelinas poderia aumentar a altura de plantas anãs, surgiu naturalmente a pergunta se as plantas possuíam suas próprias giberelinas. Logo após a descoberta dos efeitos do ácido giberélico no crescimento, substâncias tipo giberelina foram isoladas de várias espécies vegetais[1]. As *substâncias tipo giberelina* referem-se a um composto ou a um extrato que apresenta atividade biológica similar à da giberelina, mas com a estrutura química ainda não-determinada. Tal resposta indica, mas não prova, que a substância testada é uma giberelina.

Em 1958, uma giberelina (giberelina A_1) foi finalmente identificada em uma planta superior (*Phaeseolus coccineus*):

Giberelina A_1 (GA_1)

Como a concentração de giberelinas nos embriões de sementes imaturas é muito maior do que a encontrada nos tecidos vegetais, as sementes imaturas foram escolhidas para a extração desse composto. Entretanto, a concentração de giberelinas nas plantas é muito baixa (normalmente uma a 10 partes por bilhão para giberelina ativa em tecidos vegetativos e até uma parte por milhão de giberelinas totais em sementes), fazendo com que os químicos necessitassem de grandes quantidades de sementes.

Como mais e mais giberelinas foram caracterizadas a partir de fungos e plantas, acabaram sendo numeradas como giberelinas A_X (ou GA_X), onde X é um número que representa a ordem de sua descoberta. Em 1968, este esquema foi adotado para todas as giberelinas. Sendo assim, o número de uma giberelina é simplesmente uma conveniência para a catalogação, destinada a evitar o caos na sua denominação. O sistema não envolve qualquer semelhança química ou relação metabólica entre giberelinas com números próximos.

Todas as giberelinas são baseadas em um esqueleto *ent*-giberelano:

Estrutura *ent*-giberelano

Algumas giberelinas apresentam um complemento completo de 20 átomos de carbono (C_{20}-GAs):

[1]Phinney (1983) fornece um notável relato da história da descoberta da giberelina.

GA$_{12}$ (uma giberelina C$_{20}$)

Outras apresentam somente 19 (C_{19}-GAs), tendo perdido um átomo de carbono durante seu metabolismo.

Há outras variações na estrutura básica, especialmente o estado de oxidação do carbono 20 (nas C_{20}-GAs) e o número e a posição dos grupos hidroxila na molécula (ver **Tópico 20.1 na Internet**). Apesar da abundância de giberelinas presentes nos vegetais, as análises genéticas demonstraram que apenas poucas são biologicamente ativas como hormônios. Todas as demais servem como precursores ou representam formas inativas.

EFEITOS DA GIBERELINA NO CRESCIMENTO E NO DESENVOLVIMENTO

Embora tenham sido originalmente descobertas como a causa de uma doença que estimulava o alongamento dos entrenós de plantas de arroz, as giberelinas endógenas influenciam uma grande variedade de processos do desenvolvimento. Além do alongamento do caule, controlam vários aspectos da germinação de sementes, incluindo a quebra de dormência e a mobilização das reservas do endosperma. No desenvolvimento reprodutivo, a giberelina pode afetar a transição do estado juvenil para o maduro, bem como a indução da floração, a determinação do sexo e o estabelecimento do fruto (do inglês, *fruit set*). Nesta seção, serão revisados alguns desses fenômenos regulados pela giberelina.

As giberelinas estimulam o crescimento do caule em plantas anãs e em rosetas

A aplicação de giberelina promove o alongamento dos entrenós em várias espécies. No entanto, o estímulo mais pronunciado tem sido visto em espécies de plantas anãs ou em rosetas, bem como nos membros da família das gramíneas. O GA$_3$ exógeno provoca um excesso de alongamento do caule em plantas anãs, de modo que as plantas assemelham-se às variedades mais altas da mesma espécie (Figura 20.1). Associado a esse efeito há também a diminuição na espessura do caule e no tamanho da folha, além da coloração verde clara das folhas.

Algumas plantas assumem a forma de roseta em dias curtos e apresentam alongamento da parte aérea e florescimento somente em dias longos (ver Capítulo 24). A aplicação das giberelinas resulta em *bolting* (ver Glossário) em plantas mantidas sob condições de dias curtos (Figura 20.2) e o *bolting* normal é regulado pela giberelina endógena. Ademais, conforme citado, muitas plantas em roseta de dias longos apresentam uma exigência de frio para o alongamento do caule e para o florescimento, podendo esta exigência ser superada pela aplicação de giberelina.

A giberelina também promove o alongamento dos entrenós em membros da família das gramíneas. O alvo da ação das giberelinas é o **meristema intercalar**, o qual está localizado próximo à base do entrenó, que produz derivadas para cima e para baixo. O arroz irrigado é um exemplo particularmente interessante. Serão examinados os efeitos da giberelina no crescimento dessa variedade de arroz na seção dos mecanismos de alongamento do caule induzido por giberelina.

Embora o crescimento do caule possa ser significativamente aumentado por GAs, as giberelinas apresentam pouco efeito no crescimento da raiz. No entanto, o crescimento da raiz de plantas anãs extremas é menor do que o das plantas selvagens e a aplicação de giberelina à parte aérea aumenta tanto o crescimento do caule quanto o da raiz. Ainda não está esclarecido se o efeito da giberelina no crescimento da raiz é direto ou indireto.

As giberelinas regulam a transição da fase juvenil para a adulta

Muitas plantas lenhosas perenes não florescem até atingirem um certo estádio de maturidade; até esse estádio elas são ditas juvenis (ver Capítulo 24). Freqüentemente, os estádios juvenil e ma-

dwarf-1 | dwarf-1 +GA$_1$ | NORMAL +GA$_1$ | NORMAL

FIGURA 20.1 O efeito do GA$_1$ exógeno sobre o milho normal e anão (d_1). A giberelina estimula o alongamento do caule no mutante anão, mas apresenta pouco ou nenhum efeito sobre a planta do tipo selvagem (cedida por B. Phinney).

FIGURA 20.2 O repolho, uma planta de dias longos, permanece em roseta sob condições de dias curtos, mas pode ser induzida ao *bolting* e ao florescimento por aplicações de giberelina. No caso ilustrado, foram produzidas hastes gigantes, com flores (© Sylvan Wittwer/Visuals Unlimited).

em especial de plantas em rosetas (ver Capítulo 24). Ela é, então, um componente do estímulo do florescimento em algumas plantas, mas aparentemente não em outras.

Nas plantas em que as flores são predominantemente unissexuais, a determinação do sexo é geneticamente regulada. No entanto, tal característica é igualmente influenciada por fatores ambientais, como fotoperíodo e condições nutricionais, podendo esses efeitos ambientais ser mediados pela giberelina. Em milho, por exemplo, as flores estaminadas (masculinas) são restritas ao pendão e as flores pistiladas (femininas) estão contidas na espiga. A exposição a dias curtos e noites frias aumenta 100 vezes os níveis de giberelina endógena no pendão e simultaneamente causa a feminização das flores masculinas. A aplicação de ácido giberélico aos pendões também pode induzir flores pistiladas.

Para os estudos de regulação genética, foi isolada uma grande coleção de mutantes de milho que apresentam padrões alterados de determinação do sexo. As mutações em genes que afetam tanto a biossíntese de giberelinas quanto a transdução de sinal desse hormônio resultam em um defeito na supressão do desenvolvimento de estames nas flores da espiga (Figura 20.3). Assim, o principal papel da giberelina na determinação do sexo em milho parece ser a supressão do desenvolvimento do estame (Irish, 1996).

Em dicotiledôneas, como pepino, cânhamo e espinafre, a giberelina parece ter efeito oposto. Nessas espécies, sua aplicação promove a formação de flores estaminadas e os inibidores da biossíntese de giberelinas promovem a formação de plantas pistiladas.

As giberelinas promovem a frutificação

As aplicações de giberelinas podem causar o estabelecimento do fruto após a polinização e o crescimento de alguns frutos, nos casos em que a auxina não apresente efeito. Por exemplo, o estímulo do estabelecimento do fruto por giberelina foi observado em maçã (*Malus sylvestris*).

As giberelinas promovem a germinação de sementes

A germinação de sementes pode exigir giberelinas para uma das possíveis etapas: a ativação do crescimento vegetativo do embrião, o enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe seu crescimento, assim como a mobilização

duro apresentam formas foliares diferentes, como na hera (*Hedera helix*) (Figura 24.9), por exemplo. A aplicação de giberelinas pode regular esta juvenilidade em ambas as direções, dependendo da espécie. Especificamente em *H. helix*, o GA_3 provoca uma reversão do estádio maduro para o juvenil e muitas coníferas jovens podem ser induzidas a entrar na fase reprodutiva por aplicações de giberelinas não-polares, tais como GA_4+GA_7 (o último exemplo é um dos quais o GA_3 não é efetivo).

As giberelinas influenciam a iniciação floral e a determinação do sexo

Como mencionado, a giberelina pode substituir a exigência de dias longos ou de frio para o florescimento em muitas espécies,

FIGURA 20.3 Anteras em desenvolvimento nas espigas de um mutante anão de milho (*Zea mays*), deficiente em giberelina. Inferior: espiga não-fertilizada de um mutante anão *an1*, mostrando anteras conspícuas. Superior: espiga de uma planta que foi tratada com giberelina (cedida por M. G. Neuffer).

das reservas energéticas do endosperma. Algumas sementes, em especial aquelas das plantas selvagens, requerem luz ou frio para induzir a germinação. Em tais sementes, essa dormência (ver Capítulo 23) pode, muitas vezes, ser quebrada pela aplicação de giberelina. Visto que as mudanças nos níveis de giberelinas são freqüentemente, mas não sempre, observadas em resposta ao resfriamento, elas podem representar um regulador natural de um ou mais desses processos envolvidos na germinação.

A aplicação de giberelinas também estimula a produção de numerosas hidrolases, como a α-amilase, pelas células da camada de aleurona dos grãos de cereais em germinação. Esse aspecto da ação da giberelina tem promovido seu uso na produção do malte para fabricação da cerveja (discutida na próxima seção). Sendo este o principal sistema no qual as rotas de transdução de sinal de giberelina têm sido analisadas, ele será tratado com maiores detalhes mais adiante neste capítulo.

As giberelinas possuem aplicações comerciais

Os principais usos das giberelinas (GA_3, a menos que seja mencionado diferente), aplicadas por aspersão ou imersão, incluem o controle do cultivo de frutas, a maltagem da cevada e o aumento da produção de açúcar em cana-de-açúcar. Em algumas plantas cultivadas, a redução na altura é desejável, o que pode ser obtido pelo uso de inibidores da síntese de giberelinas (ver **Tópico da 20.1 Internet**).

Produção de frutos. O principal uso da giberelina é aumentar o comprimento do pedúnculo de uvas sem sementes. Devido ao pequeno comprimento dos pedúnculos individuais dos frutos, os cachos de uvas sem sementes são muito compactos e o crescimento das bagas é limitado. A giberelina estimula o crescimento dos pedúnculos, permitindo que as uvas cresçam mais pela diminuição da compactação, promovendo o alongamento do fruto (Figura 20.4).

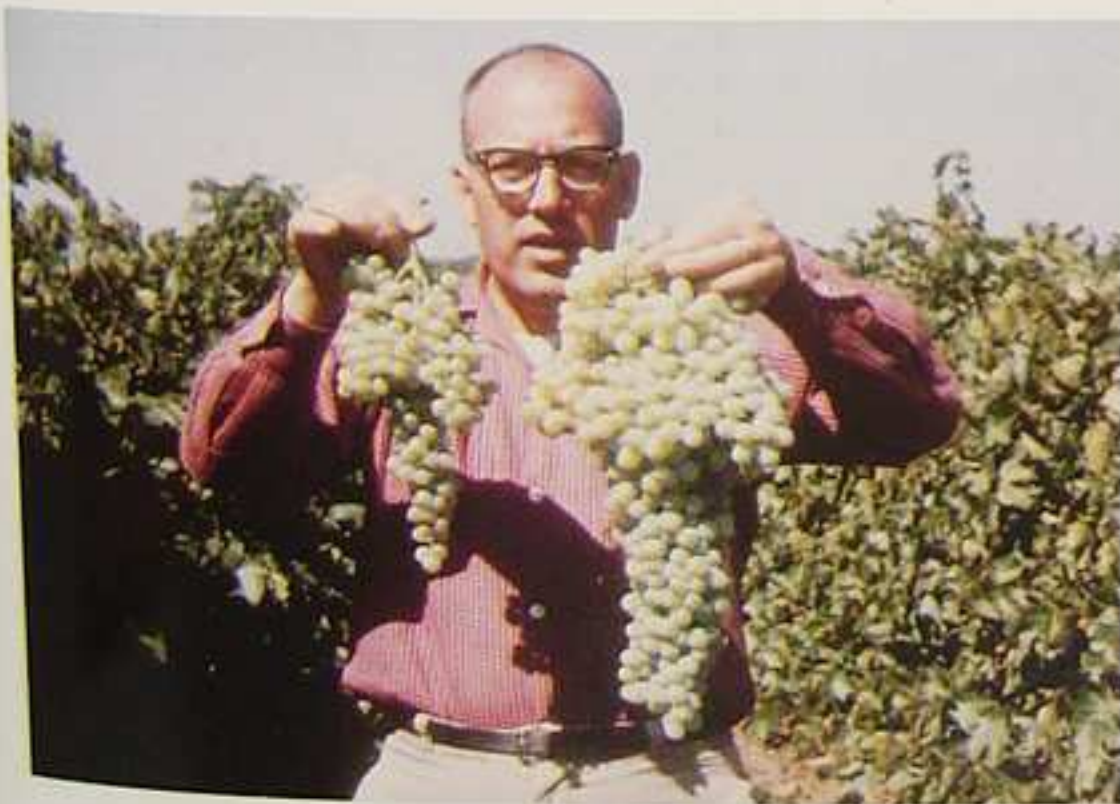



FIGURA 20.4 A giberelina induz o crescimento em uvas Thompson sem sementes. O cacho da esquerda é o controle não-tratado, enquanto o da direita foi aspergido com giberelina durante o desenvolvimento do fruto (© Sylvan Wittwer/Visuals Unlimited).

A mistura da benziladenina (uma citocinina; ver Capítulo 21) e GA_4+GA_7 pode causar o alongamento dos frutos de maçã e, sob certas condições, é utilizada para melhorar a forma de maçãs do tipo *Delicious*. Embora esse tratamento não afete a produção ou o sabor, é uma técnica comercialmente útil.

Em frutos cítricos, as giberelinas retardam a senescência, possibilitando que eles possam permanecer na árvore por mais tempo, prolongando o período de comercialização.

A maltagem da cevada. A maltagem é a primeira etapa no processo da fabricação da cerveja, quando as sementes de cevada (*Hordeum vulgare*) são germinadas sob temperaturas que maximizam a produção de enzimas hidrolíticas pela camada de aleurona. A giberelina é, algumas vezes, usada para acelerar o processo de maltagem. As sementes germinadas são, então, secadas e pulverizadas para produzir o "malte", que consiste principalmente da mistura de enzimas amilolíticas (de degradação do amido) e amido parcialmente digerido.

Durante a etapa subseqüente, a "trituração", é adicionada água, e as amilases do malte convertem o amido residual, assim como o amido adicionado, em maltose dissacarídeo, a qual é convertido em glicose pela enzima maltase. O "mosto" resultante é fervido para sustar a reação. Na etapa final, a levedura converte a glicose do mosto em etanol por fermentação.

Aumentando a produção de cana-de-açúcar. A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma das poucas plantas que armazenam seus carboidratos como açúcar (sacarose), em vez de amido (outra espécie de importância que estoca açúcar é a beterraba). Originária da Nova Guiné, a cana-de-açúcar é uma gramínea perene gigante, que pode atingir de 4 a 6 m de altura. A sacarose é armazenada nos vacúolos centrais das células parenquimáticas do entrenó. A aspersão de giberelina na plantação pode aumentar a produção bruta de cana até 20 toneladas por acre e a produção de açúcar em duas toneladas por acre. Esse aumento é resultado do estímulo do alongamento do entrenó durante o inverno.

Usos no melhoramento vegetal. O longo período de juvenilidade em coníferas pode ser prejudicial para um programa de melhoramento, por evitar a reprodução de características desejáveis por muitos anos. A aspersão com GA_4+GA_7 pode reduzir de maneira considerável o tempo de produção de sementes por induzir a formação de cones em plantas muito jovens. Além disso, a produção de flores masculinas em cucurbitáceas e a estimulação do crescimento de plantas em roseta bianuais, como beterraba (*Beta vulgaris*) e repolho (*Brassica oleracea*), constituem-se em efeitos benéficos da giberelina, que são ocasionalmente usados na produção comercial de sementes.

Inibidores da biossíntese de giberelinas. O maior nem sempre é o melhor. Assim, os inibidores da síntese de giberelinas são usados comercialmente para evitar o alongamento em algumas plantas. Em cultivos de flores, plantas pequenas e fortes como lírios, crisântemos e poinsétias são desejáveis e a restrição no crescimento por alongamento pode ser obtida por aplicações de inibidores da síntese de giberelinas como o ancimidol (conhecido comercialmente como A-rest) ou paclobutrazol (conhecido como Bonzi).

A altura é também uma desvantagem para os cereais cultivados em climas frios e úmidos, como ocorre na Europa, onde o acamamento pode ser um problema. O *acamamento* — a curvatura dos

caules em direção ao solo, causada pelo peso da água acumulada nas espigas maduras — dificulta a colheita do grão com uma colheitadeira combinada. Os entrenós mais curtos reduzem a tendência de acamamento, aumentando a produção. Mesmo o trigo geneticamente anão cultivado na Europa é pulverizado com inibidores da biossíntese de giberelina, para a redução adicional do alongamento do caule e do acamamento.

Outra aplicação de inibidores da biossíntese de giberelinas é a restrição do crescimento em plantações de arbustos nas margens das estradas.

BIOSSÍNTESE E METABOLISMO DA GIBERELINA

As giberelinas constituem uma grande família de ácidos diterpênicos e são sintetizadas por uma ramificação da **rota de terpenóides,** descrita no Capítulo 13. A elucidação da rota biossintética da giberelina não teria sido possível sem o desenvolvimento de métodos sensíveis de detecção. Como já mencionado, os vegetais possuem uma imensa variedade de giberelinas, muitas das quais *biologicamente inativas.* Nesta seção, serão discutidos a biossíntese de GAs e outros fatores que regulam os níveis estáveis da forma biologicamente ativa do hormônio em diferentes tecidos vegetais.

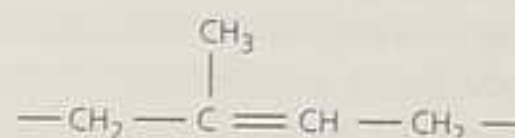
As giberelinas são medidas por meio de técnicas físicas altamente sensíveis

Os *bioensaios,* sistemas de medidas que utilizam a resposta biológica, foram originalmente importantes para detectar a atividade semelhante à das giberelinas em extratos parcialmente purificados e para avaliar a atividade biológica das giberelinas conhecidas (Figura 20.5). O uso de bioensaios, no entanto, tem diminuído com o desenvolvimento de técnicas físicas muito sensíveis, que permitem a identificação e a quantificação precisa de giberelinas específicas em pequenas quantidades de tecidos.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) de extratos vegetais, seguido de um método altamente sensível e seletivo de cromatografia gasosa combinado com espectrometria de massas (CG-EM), tem se tornado o método de escolha. Com a disponibilidade do espectro de massas publicado, os pesquisadores podem agora identificar as giberelinas sem possuir padrões puros. A disponibilidade de padrões das giberelinas comuns marcadas com isótopos pesados, os quais podem ser separadamente detectados em um espectrômetro de massas, permite a quantificação precisa dos níveis dessas substâncias nos tecidos vegetais, utilizando essas giberelinas marcadas como padrões internos para quantificação (ver **Tópico 20.2 na Internet**).

As giberelinas são sintetizadas através da rota de terpenóides em três etapas

As giberelinas são diterpenóides tetracíclicos compostos de unidades básicas pentacarbonadas (isoprenos):

$$\begin{array}{c} \quad\quad\quad CH_3 \\ \quad\quad\quad | \\ -CH_2-C=CH-CH_2- \end{array}$$

ligados cabeça-cauda. Os pesquisadores determinaram a rota biossintética completa da giberelina em sementes e tecidos vegetativos de várias espécies, pelo suprimento de vários precursores e intermediários radioativos e examinando a produção de outros compostos da rota (Kobayashi e cols., 1996).

A rota biossintética da giberelina pode ser dividida em três etapas, cada uma ocorrendo em um compartimento celular diferente (Figura 20.6) (Hedden e Phillips, 2000).

Etapa 1: Produção de precursores de terpenóides e ent-caureno nos plastídeos. A unidade básica biológica de isopreno é o isopente-

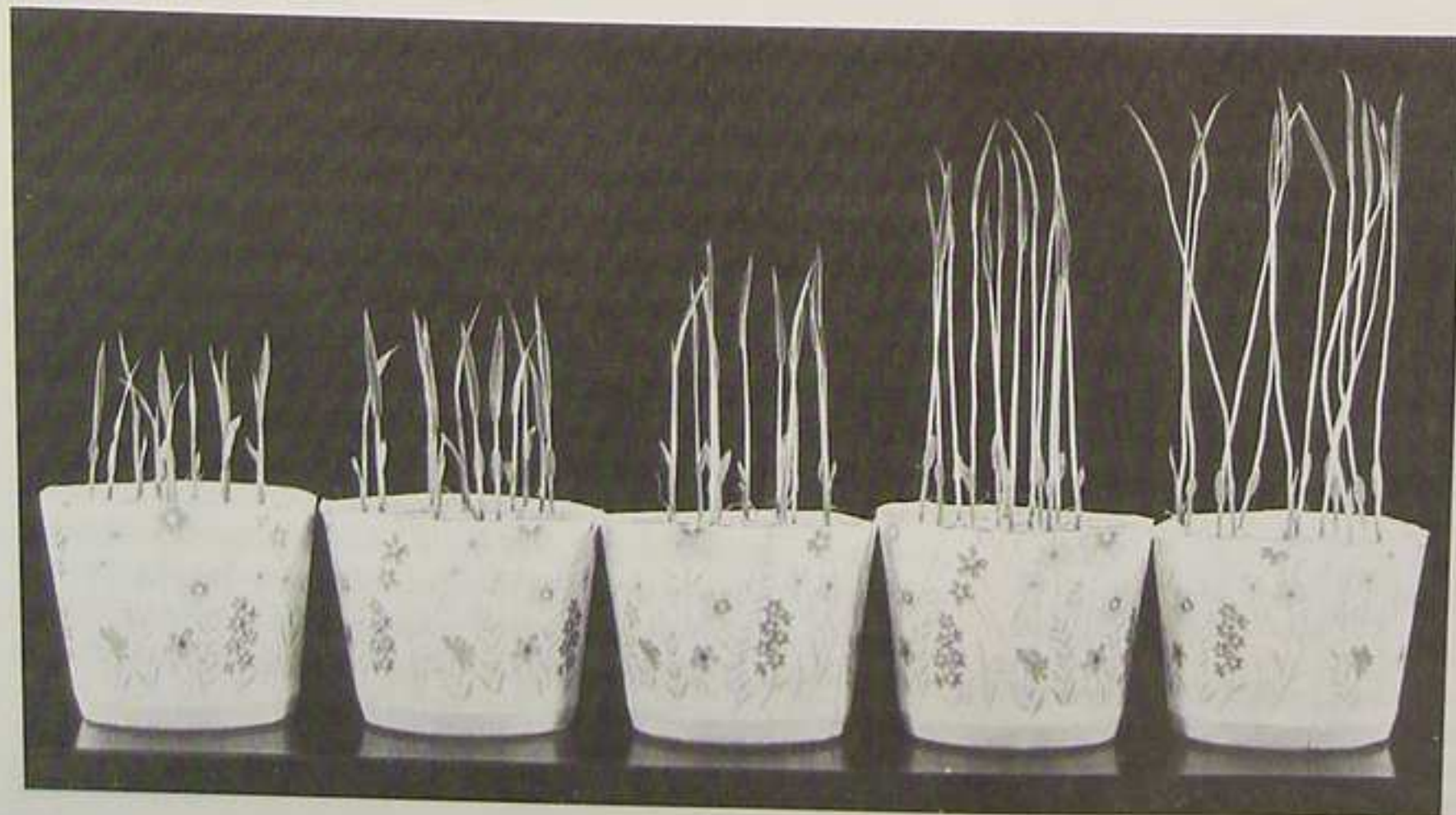



FIGURA 20.5 A giberelina causa o alongamento da bainha da folha de plântulas de arroz, resposta utilizada no bioensaio da bainha da folha do arroz anão. Aqui, plântulas de quatro dias foram tratadas com diferentes quantidades de GA e mantidas em crescimento por mais cinco dias (cedida por P. Davies).

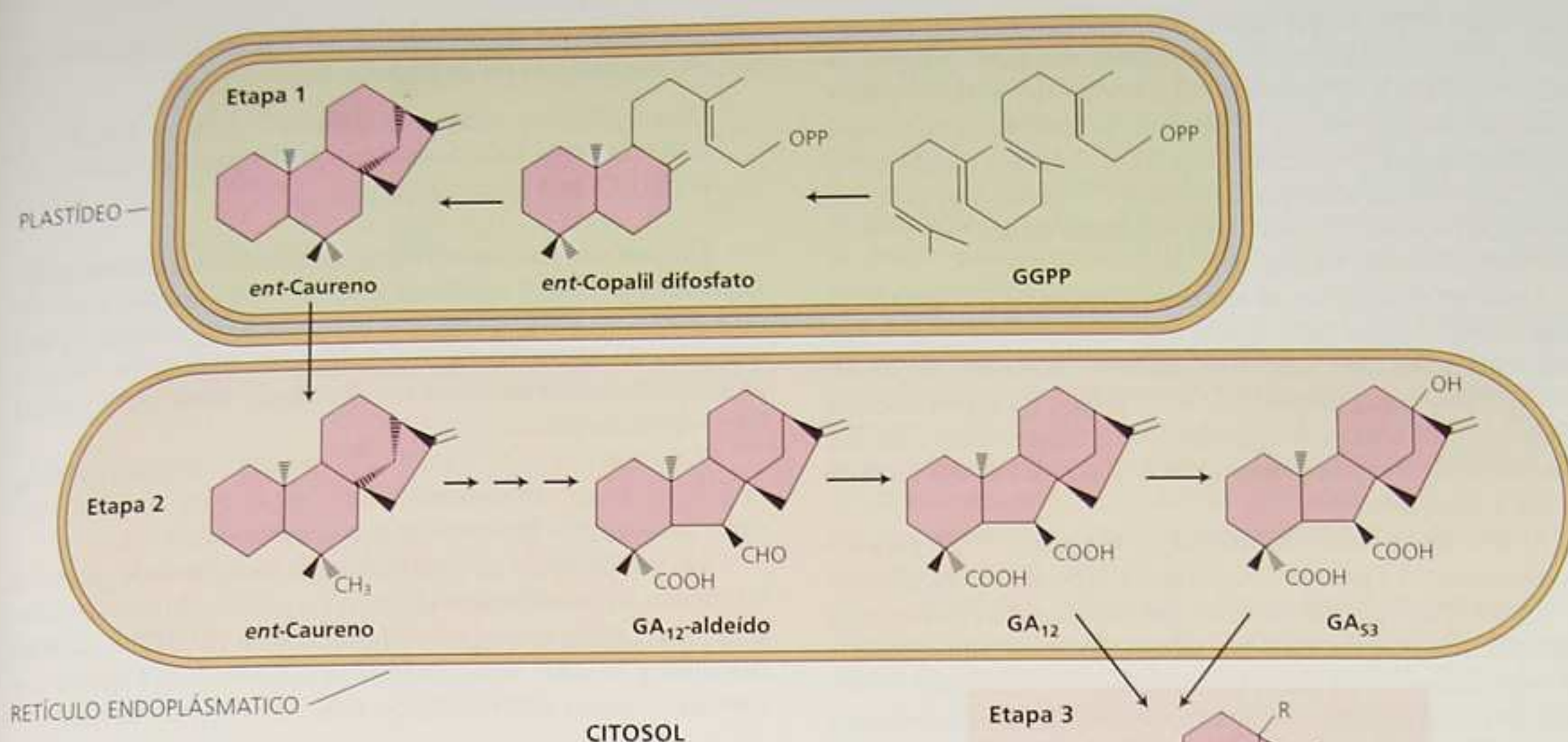
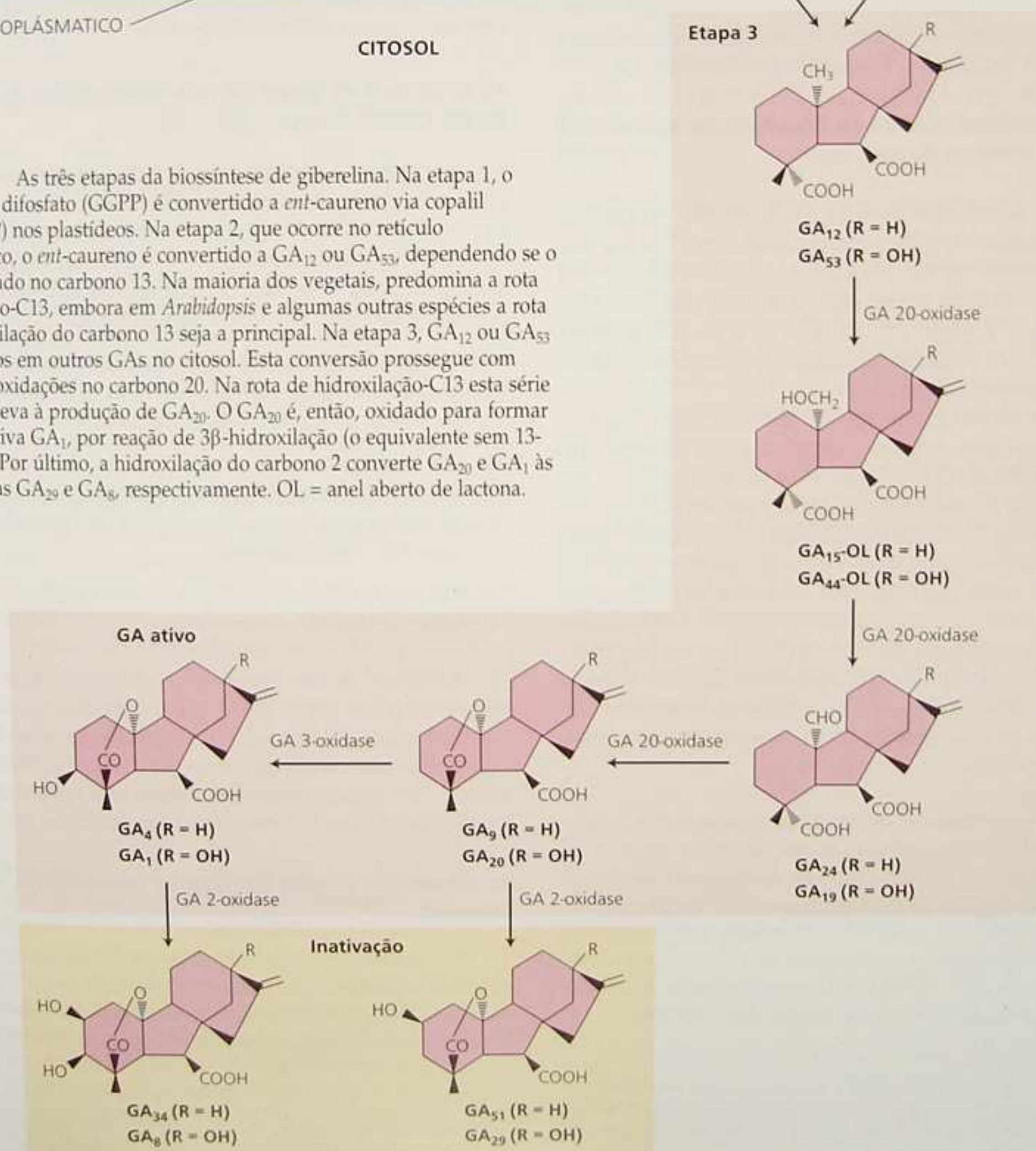



FIGURA 20.6 As três etapas da biossíntese de giberelina. Na etapa 1, o geranilgeranil difosfato (GGPP) é convertido a *ent*-caureno via copalil difosfato (CPP) nos plastídeos. Na etapa 2, que ocorre no retículo endoplasmático, o *ent*-caureno é convertido a GA_{12} ou GA_{53}, dependendo se o GA é hidroxilado no carbono 13. Na maioria dos vegetais, predomina a rota de hidroxilação-C13, embora em *Arabidopsis* e algumas outras espécies a rota de não-hidroxilação do carbono 13 seja a principal. Na etapa 3, GA_{12} ou GA_{53} são convertidos em outros GAs no citosol. Esta conversão prossegue com uma série de oxidações no carbono 20. Na rota de hidroxilação-C13 esta série de oxidações leva à produção de GA_{20}. O GA_{20} é, então, oxidado para formar a giberelina ativa GA_1, por reação de 3β-hidroxilação (o equivalente sem 13-OH é o GA_4). Por último, a hidroxilação do carbono 2 converte GA_{20} e GA_1 às formas inativas GA_{29} e GA_8, respectivamente. OL = anel aberto de lactona.

nil difosfato (IPP)[2]. O IPP, usado na síntese da giberelina em tecidos clorofilados, é sintetizado nos plastídeos a partir do gliceraldeído-3-fosfato e do piruvato (Lichtenthaler e cols., 1997). Entretanto, no endosperma de semente de abóbora, o qual é rico em giberelinas, o IPP é formado no citosol a partir do ácido mevalônico, derivado da acetil-CoA. Assim, o IPP usado para produzir giberelinas pode ser proveniente de diferentes compartimentos celulares em diferentes tecidos.

Uma vez sintetizadas, as unidades isoprênicas IPP são adicionadas sucessivamente para formar intermediários de 10 carbonos (geranil difosfato), de 15 carbonos (farnesil difosfato) e de 20 carbonos (geranilgeranil difosfato, GGPP). O GGPP é o precursor de muitos compostos terpênicos, incluindo os carotenóides e muitos óleos essenciais, sendo somente após o GGPP que a rota torna-se específica para giberelinas.

As reações de ciclização que convertem o GGPP em *ent*-caureno representam a primeira etapa, que é específica para giberelinas (Figura 20.6). As duas enzimas que catalisam as reações estão localizadas nos proplastídeos nos tecidos do ápice meristemático, mas, estão ausentes nos cloroplastos maduros (Aach e cols., 1997). Assim, as folhas perdem sua capacidade de sintetizar giberelinas a partir de IPP, uma vez que os cloroplastos estejam maduros.

Os compostos como AMO-1618, CCC e Fosfon D são inibidores específicos da primeira etapa da biossíntese de giberelinas e utilizados como redutores de crescimento.

Etapa 2: Reações de oxidação do GA_{12} e GA_{53} no RE. Na segunda etapa da biossíntese da giberelina, um grupo metil no *ent*-caureno é oxidado a ácido carboxílico, seguido pela contração do anel B de um anel de seis para um de cinco carbonos, resultando em GA_{12}-aldeído, o qual é, então, oxidado a **GA_{12}**, a primeira giberelina da rota em todos os vegetais e, portanto, o precursor de todas as demais giberelinas (ver Figura 20.6).

Nos vegetais, muitas giberelinas são também hidroxiladas no carbono 13, hidroxilação essa que ocorre na etapa seguinte, formando GA_{53} a partir de GA_{12}. Todas as enzimas envolvidas são monoxigenases, que empregam o citocromo P450 nas suas reações. Essas monoxigenases P450 estão localizadas no retículo endoplasmático. O caureno é transportado do plastídeo para o retículo e é oxidado *en route* a ácido caurenóico por uma caureno oxidase, que está associada à membrana do plastídeo (Helliwell e cols., 2001).

As conversões seguintes do GA_{12} ocorrem no retículo endoplasmático. O paclobutrazol e outros inibidores das monoxigenases P450 inibem especificamente esse estádio da biossíntese das giberelinas, antes do GA_{12}-aldeído, além de serem também, retardadores do crescimento.

Etapa 3: Formação de todas as outras giberelinas a partir de GA_{12} e GA_{53}, no citosol. Todas as etapas subseqüentes da rota (ver Figura 20.6) são realizadas por um grupo de dioxigenases no citosol. Essas enzimas necessitam de 2-oxoglutarato e de oxigênio molecular como co-substratos e usam Fe^{2+} e ascorbato como co-fatores.

As etapas específicas na modificação do GA_{12} variam de espécie para espécie e entre os órgãos da mesma espécie. Duas alterações químicas básicas ocorrem na maioria dos vegetais:

1. A hidroxilação do carbono 13 (no retículo endoplasmático) ou do carbono 3 ou de ambos.
2. Uma oxidação sucessiva do carbono 20 ($CH_2 \rightarrow CH_2OH \rightarrow CHO$). A etapa final desta oxidação é a perda do carbono 20 como CO_2 (ver Figura 20.6).

Quando tais reações envolvem as giberelinas inicialmente hidroxiladas no C-13, a resultante é GA_{20}. O GA_{20} é, então, convertido à sua forma ativa, o GA_1, por hidroxilação do carbono 3 (visto que este está na configuração beta [desenhado como se a ligação ao grupo hidroxila estivesse em direção do leitor] ela é referida como 3β-hidroxilação).

Por último, o GA_1 é inativado por sua conversão em GA_8, pela hidroxilação do carbono 2. Esta reação pode também remover o GA_{20} da rota biossintética por convertê-lo em GA_{29}.

Os inibidores do terceiro estádio da biossíntese de giberelina interferem nas enzimas que utilizam 2-oxoglutarato como co-substrato. Entre estes, o composto pro-hexadiona (BX-112) é sobremaneira útil, pois inibe especificamente a GA 3-oxidase, a enzima que converte a forma inativa GA_{20} na GA_1, ativa no crescimento.

As enzimas e os genes da rota biossintética da giberelina foram caracterizados

As enzimas da rota biossintética da giberelina são hoje conhecidas e os genes para muitas delas têm sido isolados e caracterizados (ver Figura 20.7). Duas enzimas biossintéticas são mais notáveis do ponto de vista de regulação — GA 20-oxidase (GA20ox)[3] e GA 3-oxidase (GA3ox) —, além de uma enzima envolvida no metabolismo de giberelina, a GA 2-oxidase (GA2ox):

- **GA 20-oxidase** catalisa todas as reações que envolvem as etapas sucessivas de oxidação do carbono 20 entre GA_{53} e GA_{20}, incluindo a remoção do C-20 como CO_2.
- **GA 3-oxidase** funciona como 3β-hidroxilase, adicionando um grupo hidroxila ao C-3 para formar a giberelina ativa, GA_1. (a evidência que demonstra que o GA_1 é a giberelina ativa será discutida resumidamente).
- **GA 2-oxidase** *inativa* GA_1 por catalisar a adição de um grupo hidroxila ao C-2.

A transcrição dos genes que codificam as duas enzimas da rota biossintética da giberelina, assim como a GA 2-oxidase, é altamente regulada. Os três genes têm seqüências em comum entre si e com genes que codificam outras enzimas que utilizam 2-oxoglutarato e Fe^{2+} como co-fatores. As seqüências comuns representam os sítios de ligação do 2-oxoglutarato e do Fe^{2+}.

As giberelinas podem ser ligadas covalentemente a açúcares

Embora as giberelinas ativas sejam livres, várias giberelinas glicosídeos são formadas por ligação covalente entre a giberelina e um açúcar. Tais giberelinas conjugadas prevalecem particularmente em algumas sementes. O açúcar conjugado é normalmente glicose

[2]Conforme mencionado no Capítulo 13, IPP é a abreviatura para isopentenil *pirofosfato*, o nome inicial deste composto. Da mesma forma, os outros intermediários pirofosforilados da rota são agora referidos como *difosfatos*, mas continuam a ser abreviados como se fossem chamados *pirofosfato*.

[3]*GA 20-oxidase* significa uma enzima que oxida o carbono 20; não é o mesmo que GA_{20}, que é a giberelina 20 no esquema de numeração de GAs.

Geranilgeranil difosfato
ls
Copalil difosfato
ent-Caureno
na
GA_{12}-aldeído
GA_{12}
GA_{53}
GA 20-oxidase
GA_{44}
GA 20-oxidase
GA_{19}
GA 20-oxidase
GA_{20}
GA 3-oxidase *le* — *sln* GA 2-oxidase
GA_1 — GA_{29}
sln GA 2-oxidase
GA_8

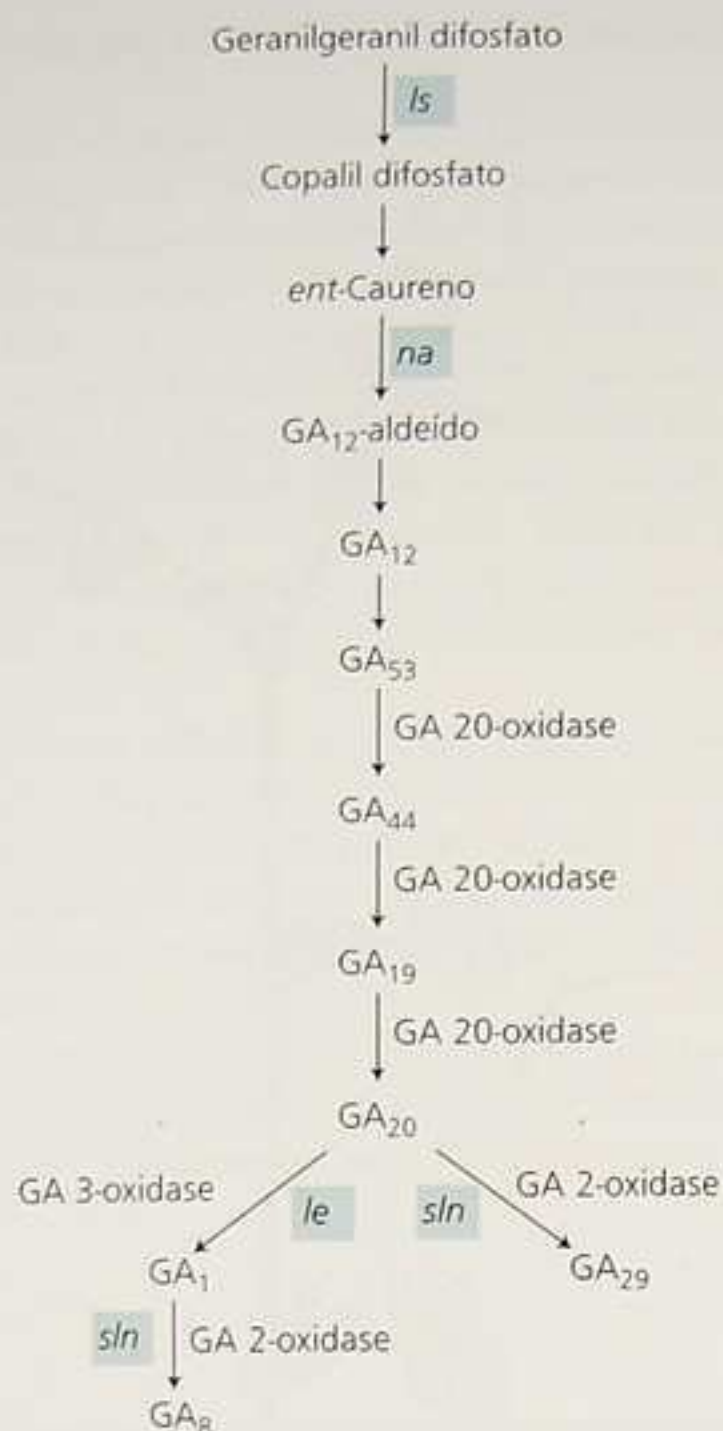



FIGURA 20.7 Uma parte da rota biossintética da giberelina, mostrando as abreviaturas e a localização dos genes mutantes que bloqueiam a rota, em plantas de ervilha, bem como as enzimas envolvidas nas etapas metabólicas após o GA_{53}.

e pode ser ligado à giberelina por meio de um grupo carboxílico, formando uma giberelina glicosídeo, ou via um grupo hidroxila, constituindo uma giberelina glicosil éter.

Quando as giberelinas são aplicadas às plantas, uma certa proporção normalmente torna-se glicosilada. Conseqüentemente, a glicosilação representa outra forma de inativação. Em alguns casos, os glicosídeos aplicados são metabolizados em GAs livres; assim, os glicosídeos podem ser uma forma de reserva das giberelinas (Schneider e Schmidt, 1990).

GA_1 é a giberelina biologicamente ativa que controla o crescimento do caule

O conhecimento das rotas biossintéticas das giberelinas revela onde e como funcionam as mutações para nanismo (Figura 20.7). Embora se acreditasse, por muito tempo, que as giberelinas eram reguladores naturais de crescimento, pois sua aplicação causava o crescimento em altura de plantas anãs, faltavam inicialmente evidências diretas. No início da década de 1980, foi demonstrado que caules de plantas altas continham mais giberelina bioativa do que os caules de plantas anãs e que os níveis endógenos da giberelina bioativa mediavam o controle genético da altura (Reid e Howell, 1995).

As giberelinas produzidas por plantas altas de ervilha, que apresentam o alelo homozigoto *Le* (tipo selvagem), foram comparadas com plantas anãs apresentando a mesma característica genética, com exceção do alelo *le* (mutante). *Le* e *le* são dois alelos de um gene que regula a altura de plantas de ervilha, a primeira característica genética investigada por Gregor Mendel, em seu trabalho pioneiro em 1866. Atualmente, sabemos que as plantas altas de ervilha contêm muito mais GA_1 ativo do que plantas anãs (Ingram e cols., 1983).

Como foi mostrado, o precursor de GA_1 em plantas superiores é o GA_{20} (GA_1 é 3β-OH GA_{20}). Se o GA_{20} é aplicado a plantas anãs de ervilha, homozigotas *le*, não há resposta, embora elas respondam à aplicação do GA_1. A conclusão é que o gene *Le* permite às plantas converter GA_{20} em GA_1. Estudos de metabolismo, utilizando isótopos estáveis e radioativos demonstraram, de modo conclusivo, que o gene *Le* codifica uma enzima que 3β-hidrolisa o GA_{20} para produzir GA_1 (Figura 20.8).

O gene *Le* de Mendel foi isolado e demonstrado que seu alelo recessivo apresenta uma única mudança de base, levando à produção de uma enzima defectiva, que apresenta apenas 1/20 da atividade da enzima do tipo selvagem. Assim, menos GA_1 é produzido e as plantas são anãs (Lester e cols., 1997).

Os níveis endógenos do GA_1 estão relacionados com a altura

Embora as partes aéreas de plantas anãs de ervilha giberelina-deficientes (*le*) sejam muito mais curtas do que as de plantas normais (entrenós de 3 cm em plantas maduras anãs contra 15 cm em plantas normais maduras), a mutação é *leaky* (i. é, o gene mutante produz uma enzima parcialmente ativa) e há vestígios de GA_1 endógeno promovendo o crescimento. Diferentes alelos *le* dão origem a plantas de ervilha que diferem nas suas alturas, e a altura da planta tem sido relacionada à quantidade de GA_1 endógeno (Figura 20.9).

Há um mutante anão extremo de ervilha que apresenta ainda menos giberelinas, a qual possui o alelo *na* (o tipo selvagem do alelo é *Na*), o qual bloqueia completamente a biossíntese da giberelina entre o *ent*-caureno e o GA_{12}-aldeído (Reid e Howell, 1995). Como resultado, os mutantes homozigotos (*nana*), os quais são quase completamente livres de giberelinas, atingem uma altura de cerca de 1 cm na maturidade (Figura 20.10)

No entanto, plantas *nana* podem ainda apresentar uma 3β-hidroxilase ativa, codificada pelo gene *Le*, e então converter GA_{20}

OH
CH_2
+ OH
GA 3β-hidroxilase
COOH
HO
CH_3
GA_{20}
GA_1

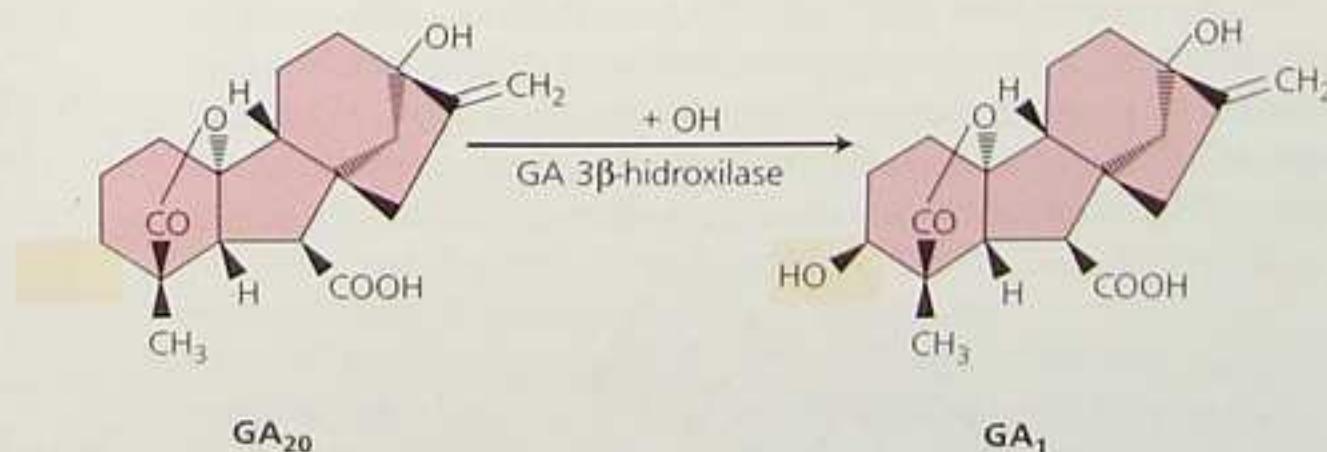



FIGURA 20.8 Conversão do GA_{20} em GA_1 pela 3β-hidroxilase, a qual adiciona um grupo hidroxila (OH) ao carbono 3 da GA_{20}.

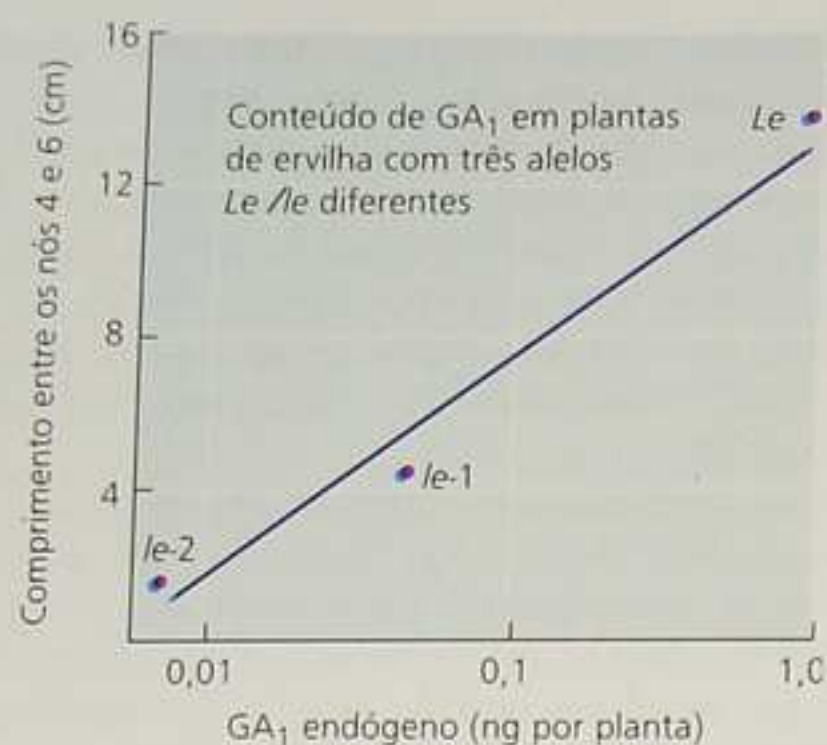



FIGURA 20.9 O alongamento do caule corresponde exatamente ao nível de GA_1. Nesse caso, a quantidade de GA_1 em ervilhas com três alelos diferentes no locus *Le* está plotado contra o alongamento dos entrenós em plantas com aqueles alelos. O alelo *le*-2 é o que causa nanismo mais intenso do que o alelo regular *le*-1. Há uma correlação exata entre o nível de GA e o alongamento dos entrenós (Ross e cols., 1989).

em GA_1. Se uma parte aérea *nana naLe* é enxertada em uma planta anã *le*, a planta resultante será alta, visto que o ápice caulinar *nana* pode converter GA_{20} da planta anã em GA_1.

Tais observações têm levado à conclusão de que GA_1 é a giberelina biologicamente ativa, que regula a altura das plantas de ervilha (Ingram e cols., 1986; Davies, 1995). Em estudos paralelos, o mesmo resultado foi obtido para milho, uma monocotiledônea, utilizando genótipos que bloqueiam a rota da biossíntese de giberelina. Assim, o controle do alongamento do caule pela giberelina parece ser universal.

Embora o GA_1 pareça ser a principal giberelina ativa no crescimento do caule para a maioria das espécies, poucas outras giberelinas apresentam atividade biológica em outras espécies ou tecidos. Por exemplo, GA_3, que difere do GA_1 por apresentar uma ligação dupla, é relativamente raro em plantas superiores, mas é capaz de substituir GA_1 na maioria dos bioensaios:

Ácido giberélico (GA_3)

GA_4, no qual falta um grupo OH no carbono 13, está presente em *Arabidopsis* e nos membros da família Cucurbitaceae. Em bioensaios, é tão ativo quanto GA_1, às vezes ainda mais, indicando que o GA_4 é a giberelina ativa nas espécies onde ela ocorre (Xu e cols., 1997). A estrutura do GA_4 é a seguinte:

Giberelina A_4 (GA_4)

FIGURA 20.10 Fenótipos e genótipos de ervilhas que diferem no conteúdo de giberelina nos tecidos vegetativos (todos os alelos estão em homozigose) (Davies, 1995).

As giberelinas são sintetizadas nos tecidos apicais

Os níveis mais altos de giberelinas foram encontrados em sementes imaturas e nos frutos em desenvolvimento. Entretanto, pelo fato de o nível de giberelina normalmente decrescer a zero em sementes maduras, não há evidências de que as plântulas obtêm qualquer giberelina ativa das suas sementes.

Os trabalhos com plântulas de ervilha indicam que as enzimas biossintéticas de giberelina e a GA3ox estão especificamente localizadas nas gemas apicais, folhas, assim como nos entrenós jovens e em crescimento ativo (Elliott e cols., 2001). Em *Arabidopsis*, a GA20ox é expressa principalmente nas gemas apicais e folhas jovens, que parecem ser os sítios principais de síntese de giberelinas (Figura 20.11).

As giberelinas sintetizadas na parte aérea podem ser transportadas para o resto da planta por meio do floema. Os intermediários da síntese de giberelinas podem também ser translocados no floema. Na verdade, as etapas iniciais da biossíntese de giberelina podem ocorrer em um tecido e o metabolismo para torná-la ativa em outro.

As giberelinas também têm sido identificadas nos exudados de raiz e extratos de raiz, sugerindo que este órgão também pode sintetizar giberelinas e transportá-las para a parte aérea pelo xilema.

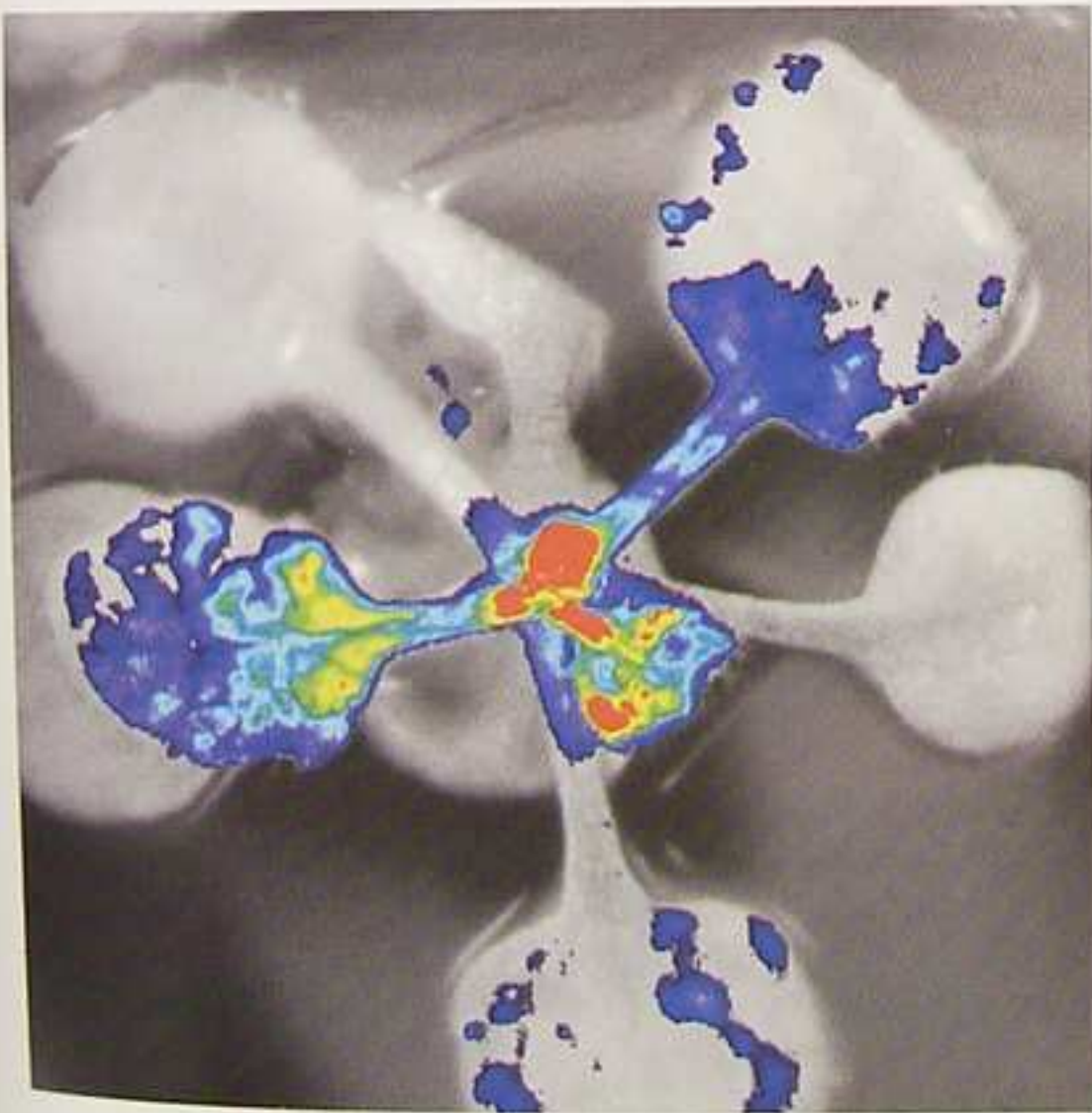



FIGURA 20.11 A giberelina é sintetizada principalmente no ápice caulinar e nas folhas jovens em desenvolvimento. A falsa cor desta imagem mostra a luz emitida por plantas transgênicas de *Arabidopsis*, expressando a seqüência de codificação da luciferase de vagalume ligada ao promotor do gene GA20ox. A luz emitida foi gravada por uma câmera CCD após a roseta haver sido aspergida com o substrato luciferina. As cores da imagem foram codificadas para intensidade e sobrepostas na fotografia da mesma planta. As regiões vermelhas e amarelas correspondem à maior intensidade de luz (cedida por Jeremy P. Coles, Andrew L. Phillips e Peter Hedden, IACR-Long Ashton Research Station).

A giberelina regula seu próprio metabolismo

A giberelina endógena regula seu próprio metabolismo, ao desviar ou inibir a transcrição de genes que codificam as enzimas para as vias de biossíntese e degradação de giberelinas (regulação por *feedback* e *feed-forward*, respectivamente). Sendo assim, o nível de giberelinas ativas é mantido com pouca variação, contanto que os precursores estejam disponíveis e as enzimas da biossíntese e da degradação da giberelina sejam funcionais.

Por exemplo, a aplicação de giberelina provoca uma diminuição da expressão dos genes biossintéticos — GA20ox e GA3ox — e um aumento na transcrição do gene de degradação — GA2ox (Hedden e Phillips, 2000; Elliott e cols., 2001). Uma mutação no gene GA2-oxidase, evitando a degradação do GA_1, é funcionalmente equivalente à aplicação de giberelina exógena na planta, produzindo o mesmo efeito na transcrição do gene biossintético.

Por outro lado, uma mutação que diminui os níveis de giberelina ativa, como GA_1, estimula na planta a transcrição dos genes biossintéticos — GA20ox e GA3ox — e diminui a expressão da enzima de degradação — GA2ox. Em ervilhas isto é particularmente evidente nas plantas muito anãs, como aquelas com a mutação no gene *LS* (CPP sintase) ou, mesmo, de modo mais severo, em plantas anãs *na* (defectivas na GA_{12}-aldeído sintase) (Figura 20.12).

As condições ambientais podem alterar a transcrição dos genes da biossíntese da giberelina

As giberelinas apresentam papel importante na mediação dos efeitos dos estímulos ambientais no desenvolvimento vegetal. Os fatores ambientais, tais como fotoperíodo e temperatura, podem alterar os níveis de giberelinas ativas, atingindo a transcrição de genes de etapas específicas da rota biossintética (Yamaguchi e Kamiya, 2000).

A regulação da biossíntese de GA_1 pela luz. A presença de luz tem muitos efeitos marcantes. Algumas sementes germinam apenas na luz e, nesses casos, a aplicação de giberelina estimula a germinação no escuro. A promoção da germinação pela luz foi determinada como sendo devida ao aumento nos níveis de GA_1, resultante do aumento da transcrição do gene que codifica a enzima GA3ox, a qual converte GA_{20} a GA_1 (Toyomasu e cols., 1998). Tal efeito mostra a fotorreversibilidade do vermelho/vermelho-distante e é mediado por fitocromo (ver Capítulo 17).

Quando uma plântula é exposta à luz assim que emerge do solo, ela muda sua forma (ver Capítulo17), um processo referido como desestiolamento (do inglês, *de-etiolation*). Uma das mudanças mais sérias é o decréscimo na taxa do alongamento do caule, de modo que um caule na luz é mais curto do que um no escuro. Inicialmente, admitiu-se que plantas crescidas na luz conteriam menos GA_1 do que plantas que crescessem em ausência de luz. No entanto, foi descoberto que as plantas da luz contêm *mais* GA_1 do que as plantas do escuro — indicando que o desestiolamento é um processo complexo envolvendo mudanças nos níveis de GA_1, bem como mudanças na resposta da planta ao GA_1.

Em ervilhas, por exemplo, o nível de GA_1 decresce nas primeiras quatro horas após de exposição à luz, devido a um aumento na transcrição do gene que codifica GA2ox, com conseqüente aumento da degradação da GA_1 (Figura 20.13A). O nível de GA_1 permanece baixo por mais um dia, mas aumenta em seguida, de

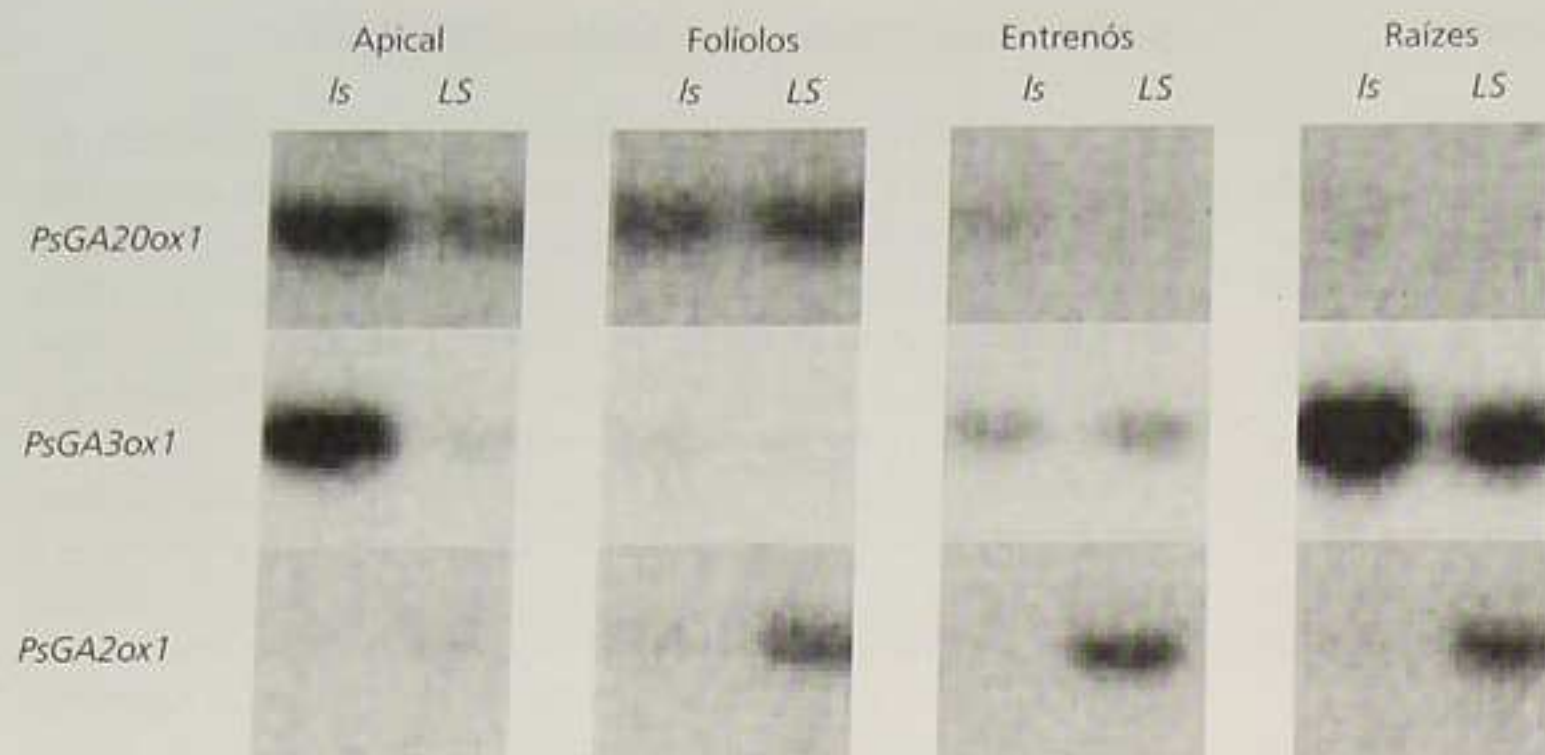



FIGURA 20.12 *Northern Blots* de mRNA de enzimas da biossíntese de giberelina em diferentes tecidos de plantas de ervilha. Quanto mais intensa a banda, maior a presença de mRNA. As plantas designadas com *LS* são altas do tipo selvagem. Aquelas denominadas *ls* são mutantes anãs, devido à presença da copalil difosfato sintase defectiva, que bloqueia a biossíntese de GA. As diferenças na intensidade das bandas mostram que um baixo nível de GA_1 nas plantas mutantes *ls* provoca um aumento da biossíntese do GA_1 pelas GA20ox e GA3ox e a repressão da degradação do GA_1 pela GA2ox (Elliott e cols., 2001).

modo que em cinco dias ocorre um aumento de cinco vezes no nível de GA_1 no caule, mesmo que a taxa de alongamento do caule seja menor (Figura 20.13B) (O'Neill e cols., 2000). A razão pela qual o crescimento diminui, apesar do aumento no nível de GA_1, é que as plantas são, nessas circunstâncias, *menos sensíveis* ao GA_1 presente.

Conforme será discutido aqui, a sensibilidade à giberelina ativa é controlada por componentes da rota de transdução de sinal da giberelina.

Regulação da biossíntese do GA_1 pelo fotoperíodo. Quando as plantas que necessitam de dias longos para florescer (ver Capítulo 24) são transferidas de dias curtos para longos, o metabolismo da giberelina é alterado. No espinafre (*Spinacia oleracene*), sob condições de dias curtos, as plantas mantêm a forma de roseta (Figura 20.14) e o nível de giberelinas hidroxiladas no carbono 13 é relativamente baixo. Em resposta ao aumento do comprimento do dia, as partes aéreas das plantas de espinafre começam a alongar após cerca de 14 dias.

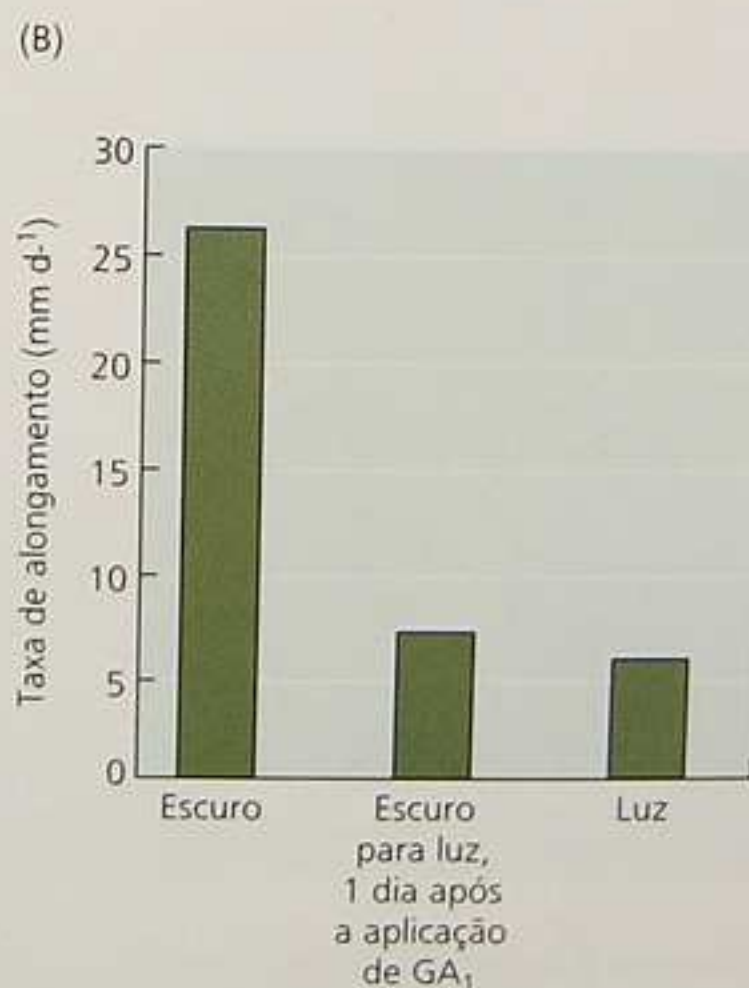



FIGURA 20.13 Quando uma planta cresce na luz, a taxa de extensão diminui devido à regulação por mudanças nos níveis hormonais ou na sensibilidade aos reguladores de crescimento. (A) Quando plântulas de ervilha, crescidas no escuro, são transferidas para a luz, os níveis do GA_1 diminuem rapidamente, devido ao metabolismo do GA_1, mas aumentam para níveis similares aos das plantas em presença de luz, em quatro dias. (B) Para investigar a resposta a GA_1 em vários regimes de luz, 10 μg de GA_1 foram aplicados no entrenó de plantas *na* deficiente em giberelina no escuro, um dia após o início da condição com luz ou seis dias de luz contínua e o crescimento nas 24 horas seguintes foi medido. Os resultados demonstram que a sensibilidade a giberelina das plântulas de ervilha decresce rapidamente após a transferência do escuro para a luz, de forma que a taxa de alongamento das plantas na luz é menor do que no escuro, mesmo embora o seu conteúdo total de GA_1 seja maior (O'Neill e cols., 2000).

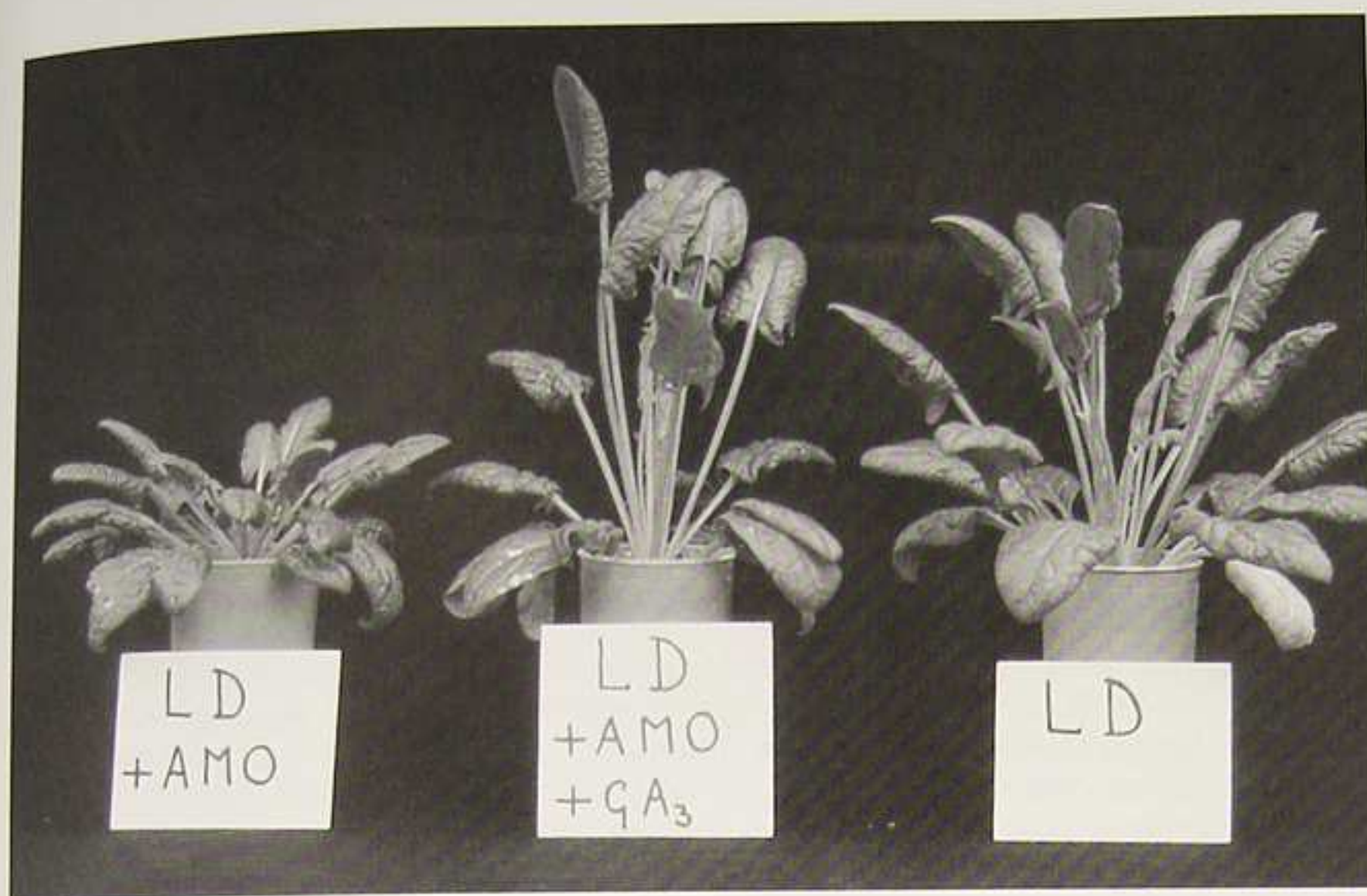



FIGURA 20.14 Plantas de espinafre sofrem alongamento do caule e do pecíolo somente sob condições de dias longos, permanecendo na forma de roseta em dias curtos. O tratamento com o inibidor da biossíntese de giberelina AMO-1618 impede o alongamento do caule e do pecíolo e mantém o hábito de crescimento em forma de roseta, mesmo sob dias longos. O ácido giberélico pode reverter o efeito inibidor do AMO-1618 no processo de alongamento. Como apresentado na Figura 20.16, dias longos causam mudanças no conteúdo de giberelina das plantas (cedida por J.A.D. Zeevaart).

Os níveis de todas as giberelinas da rota da giberelina C13-hidroxilada ($GA_{53} \rightarrow GA_{44} \rightarrow GA_{19} \rightarrow GA_{20} \rightarrow GA_1 \rightarrow GA_8$) começa a aumentar após cerca de quatro dias (Figura 20.15). Embora o nível de GA_{20} aumente 16 vezes nos primeiros 12 dias, é o acréscimo de cinco vezes em GA_1 que induz o crescimento do caule (Zeevaart e cols., 1993).

A dependência do crescimento do caule pela GA_1 tem sido mostrada pelo uso de diferentes inibidores da síntese e do metabolismo da giberelina. Os inibidores AMO-1618 e BX-1112 evitam o alongamento dos entrenós (*bolting*). O efeito do AMO-1618, que bloqueia a biossíntese de giberelina antes do GA_{12}-aldeído, pode ser revertido pela aplicação de GA_{20} (Figura 20.16A). Entretanto, o efeito de outro inibidor, o BX-112, que bloqueia a produção de GA_1 a partir de GA_{20}, somente pode ser revertido por GA_1 (Figura 20.16B). Tal resultado demonstra que o aumento de GA_1 é o fator crucial na regulação do crescimento do caule de espinafre.

O nível do mRNA mensageiro da GA20-oxidase em tecidos de plantas de espinafre, que ocorre em quantidade mais alta nos ápices caulinares e caules em crescimento (ver Figura 20.11), é aumentado sob condições de dias longos (Wu e cols., 1996). O fato que a GA20-oxidase é a enzima que converte GA_{53} em GA_{20} (ver Figura 20.7) explica por que a concentração de GA_{20} foi mais alta em plantas de espinafre sob condições de dias longos (Zeevaart e cols., 1993).

O fotoperíodo controla a formação de tubérculo. A tuberização da batata é outro processo regulado pelo fotoperíodo (Figura 20.17). Os tubérculos são formados em batatas selvagens somente em condições de dias curtos (embora a necessidade de dias curtos tenha sido eliminada em muitas variedades cultivadas) e essa tuberização pode ser bloqueada por aplicações de giberelina. Verificou-se que a transcrição de GA20ox oscilava durante o ciclo luz-escuro,

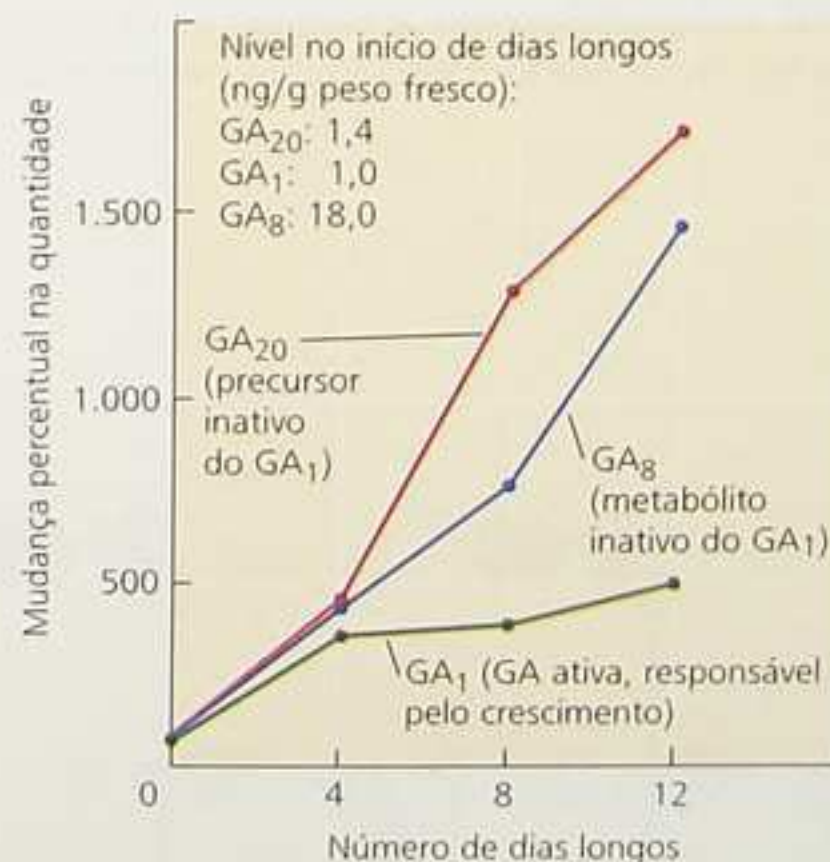



FIGURA 20.15 O incremento de cinco vezes nos níveis de GA_1 é o que causa o crescimento em plantas de espinafre expostas a um aumento do número de dias longos, embora esse crescimento ocorra antes do alongamento do caule, que inicia em cerca de 14 dias (Davies, 1995, adaptada dos dados de Zeevaart e cols., 1993).

(A) AMO-1618

AMO-1618, que bloqueia a biossíntese de GA na etapa de ciclização, não inibe o crescimento em presença de GA_{20} ou GA_1.

(B) BX-112

Por outro lado, BX-112, que bloqueia a conversão de GA_{20} em GA_1, inibe o crescimento mesmo em presença de GA_{20}.

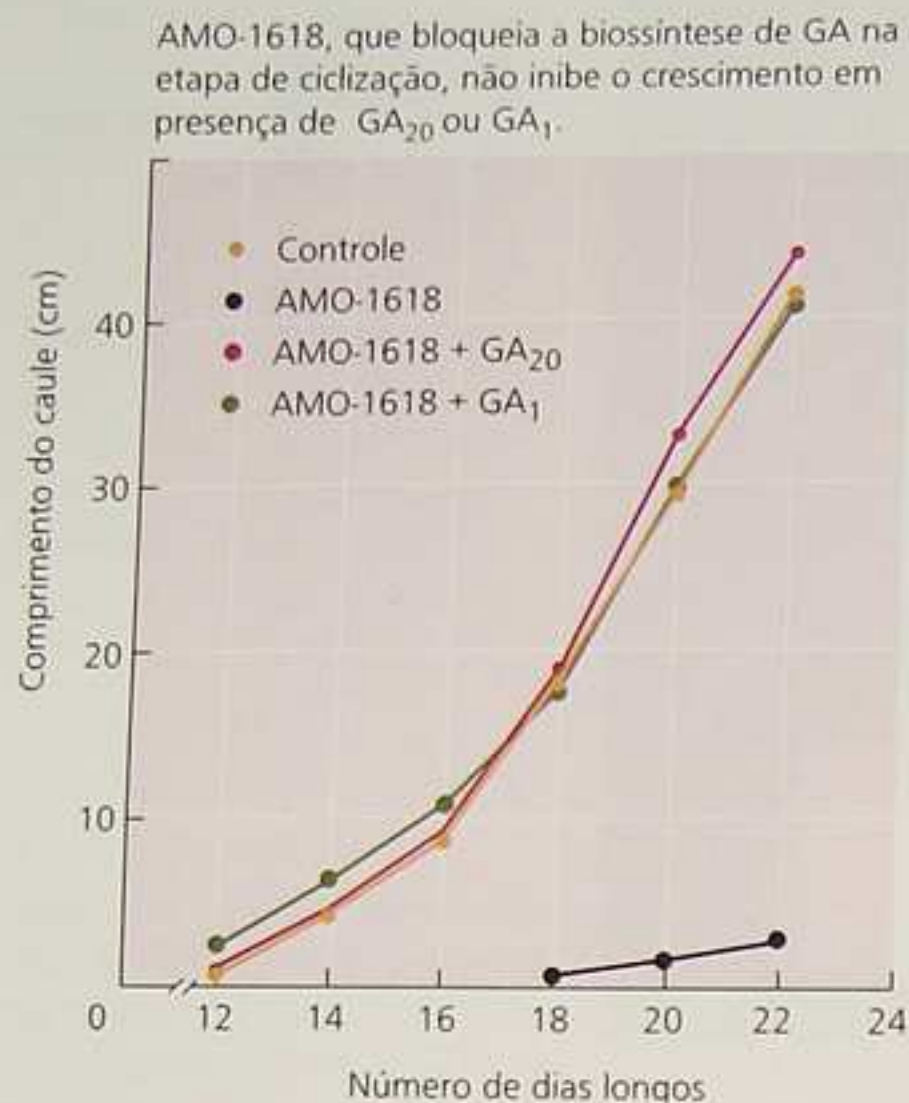
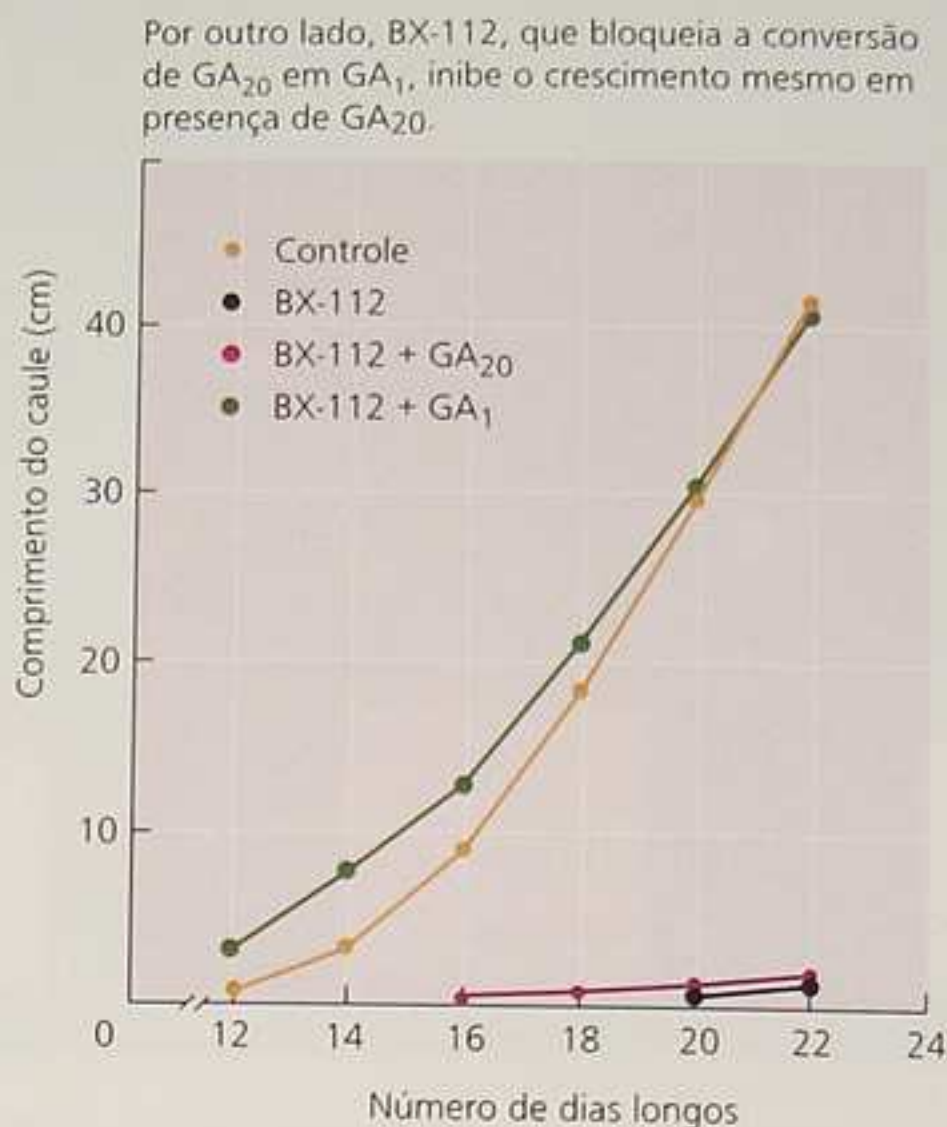



FIGURA 20.16 O uso de retardantes específicos de crescimento (inibidores da síntese de GA) e a reversão dos seus efeitos por diferentes GAs pode mostrar quais etapas da biossíntese são reguladas por mudanças ambientais, no caso o efeito de dias longos no crescimento do caule de plantas de espinafre. Não foram adicionados inibidores ou GA ao controle (Zeevaart e cols., 1993).

ocasionando níveis mais baixos de GA_1 em dias curtos. As plantas de batata que superexpressam o gene GA20ox apresentam retardo na tuberização, enquanto que a transformação com o gene GA20ox anti-senso promoveu a tuberização, demonstrando a importância da transcrição deste gene na regulação da formação de tubérculos em batata (Carrera e cols., 2000).

Em geral, o desestiolamento, a germinação de sementes dependente da luz, o controle fotoperiódico do crescimento do caule em plantas em roseta e a tuberização em batata são processos mediados pelo fitocromo (ver Capítulo 17). Há evidências que muitos dos efeitos do fitocromo são em parte devidos à modulação dos níveis de giberelinas pelas alterações na transcrição de genes para biossíntese e degradação de tais hormônios.

Efeitos da temperatura. As temperaturas baixas são necessárias para a germinação de algumas sementes (estratificação) e para o

FIGURA 20.17 A tuberização de batatas é promovida por dias curtos. As plantas de batata (*Solanum tuberosum spp. Andigena*) foram cultivadas sob condições de dias longos ou de dias curtos. A formação de tubérculos em dias curtos está associada ao declínio nos níveis de GA_1 (ver Capítulo 24) (cedida por S. Jackson).

Dias longos

Dias curtos

florescimento em certas espécies (vernalização) (ver Capítulo 24). Por exemplo, um tratamento prolongado de frio é necessário para o alongamento do caule e para o florescimento de *Thalaspi arvense* e a giberelina pode substituir o tratamento de frio.

Na ausência do tratamento de frio, o ácido *ent*-caurenóico é acumulado em grandes quantidades nos ápices caulinares, local onde também ocorre a percepção do estímulo do frio. Após esse tratamento e o retorno para altas temperaturas, o ácido *ent*-caurenóico é convertido em GA_9, a giberelina mais ativa na estimulação da resposta de florescimento. Tais resultados são consistentes com um aumento, induzido pelo frio, da atividade da enzima ácido *ent*-caurenóico-hidrolase nos ápices caulinares (Hazebroek e Metzger, 1990).

A auxina promove a biossíntese da giberelina

Embora freqüentemente discuta-se a ação dos hormônios como se eles agissem de modo independente, as inter-relações do crescimento e do desenvolvimento vegetal resultam da combinação de muitos sinais. Além disso, um hormônio pode influenciar a biossíntese de outro, de modo que os efeitos produzidos por um podem ser, de fato, mediado por outros.

Por exemplo, há muito tempo, sabe-se que a auxina induz a biossíntese de etileno. Atualmente, está evidente que a giberelina pode induzir a síntese de auxina e vice-versa. Se plantas de ervilha são decapitadas, ocasionando a interrupção no alongamento do caule, não é somente o nível da auxina que é reduzido, pois sua fonte foi removida, mas também o nível de GA_1 na parte superior do caule diminui drasticamente. Essa mudança pode ser devida à auxina, visto que a reposição da gema com suprimento de auxina restaura o nível de GA_1 (Figura 20.18).

A presença de auxina foi relacionada à promoção da transcrição do gene GA3ox e à repressão da transcrição do gene *GA2ox* (Figura 20.19). Na ausência de auxina, ocorre o inverso. Desta forma, a gema apical promove o crescimento tanto através da biossíntese direta da auxina quanto da biossíntese de GA_1 induzida por auxina (Figura 20.20) (Ross e cols., 2000; Ross e O'Neil, 2001).

A Figura 20.21 resume alguns dos fatores que modulam os níveis de giberelina ativa pela regulação da transcrição dos genes para a biossíntese ou metabolismo de giberelina.

O nanismo pode ser geneticamente modificado

A caracterização da biossíntese de giberelina e do metabolismo dos genes — *GA20ox*, *GA3ox* e *GA2ox*-tem permitido aos geneticistas modificar a transcrição de tais genes para alterar os níveis de giberelina na planta e, assim, afetar sua altura (Hedden e Phillips, 2000). O efeito desejado é normalmente o aumento do nanismo, pois as plantas cultivadas em densas comunidades, como os cereais, muitas vezes crescem muito e apresentam tendência ao acamamento. Além disso, visto que as giberelinas regulam o *bolting*, é possível impedir tal efeito inibindo o aumento desses hormônios, como por exemplo a inibição do *bolting* da beterraba.

A beterraba é uma planta bianual, que forma uma raiz intumescida de reserva na primeira estação e floresce, produzindo sementes na segunda. Para aumentar o período de cultivo e obter beterrabas maiores, os agricultores as semeiam o mais cedo possível na primavera, o que pode levar ao *bolting* no primeiro ano, resultando na ausência de formação de raízes. A redução na capacidade de produção de giberelina inibe o *bolting*, permitindo a semeadura precoce e, conseqüentemente, o crescimento de beterrabas maiores.

As reduções nos níveis de GA_1 têm sido recentemente obtidas em plantas cultivadas, como a beterraba e o trigo, tanto pela transformação de plantas com construções anti-senso dos genes *GA20ox* ou *GA3ox*, que codificam enzimas responsáveis pela síntese de GA_1, quanto pela superexpressão do gene responsável pelo metabolismo do GA_1: o *GA2ox*. Qualquer uma das abordagens resulta em nanismo no trigo (Figura 20.22) ou na inibição do *bolting* em plantas em roseta, como a beterraba.

A inibição da produção de sementes em tais plantas transgênicas pode ser revertida por aspersão com uma solução de giberelina, desde que a redução na giberelina tenha sido obtida pelo bloqueio dos genes das enzimas biossintéticas desse hormônio, a

Nível de GA_1, ng.g^{-1}
15
10
5
0
Intacta
Decapitada
Decapitada + AIA
7
6
Intacta
Decapitada
Decapitada + AIA

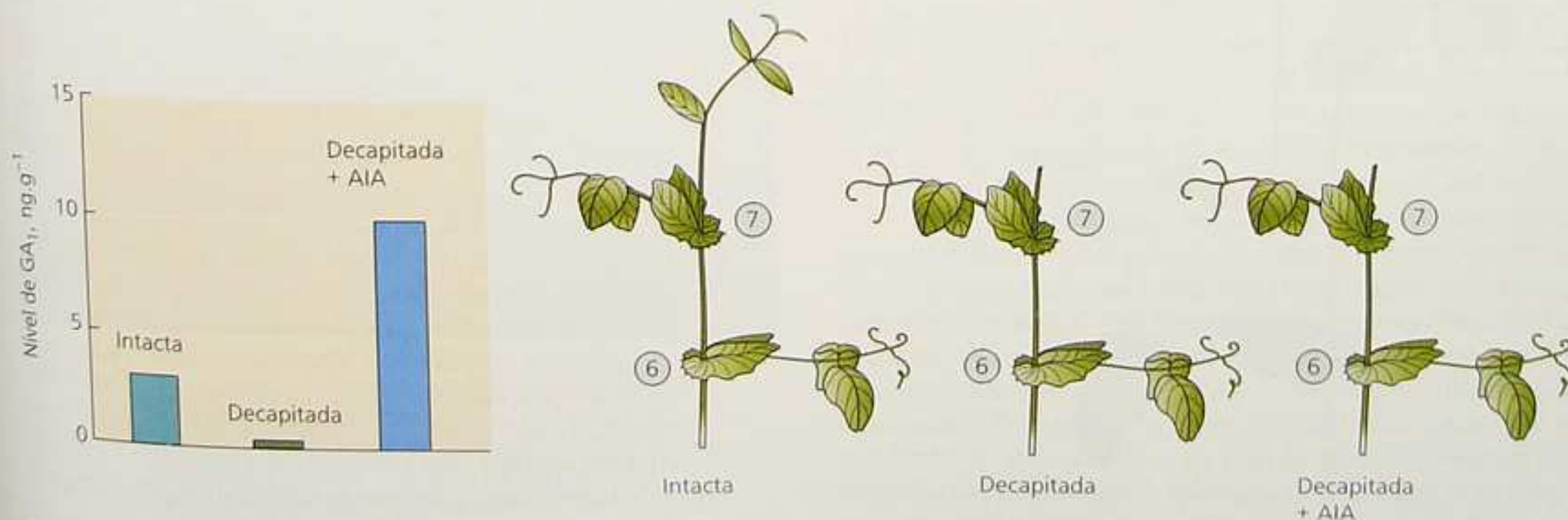



FIGURA 20.18 A decapitação reduz e o AIA restabelece o conteúdo de GA_1 endógeno em plantas de ervilha. Os números são referentes aos nós foliares (Ross e cols., 2000).

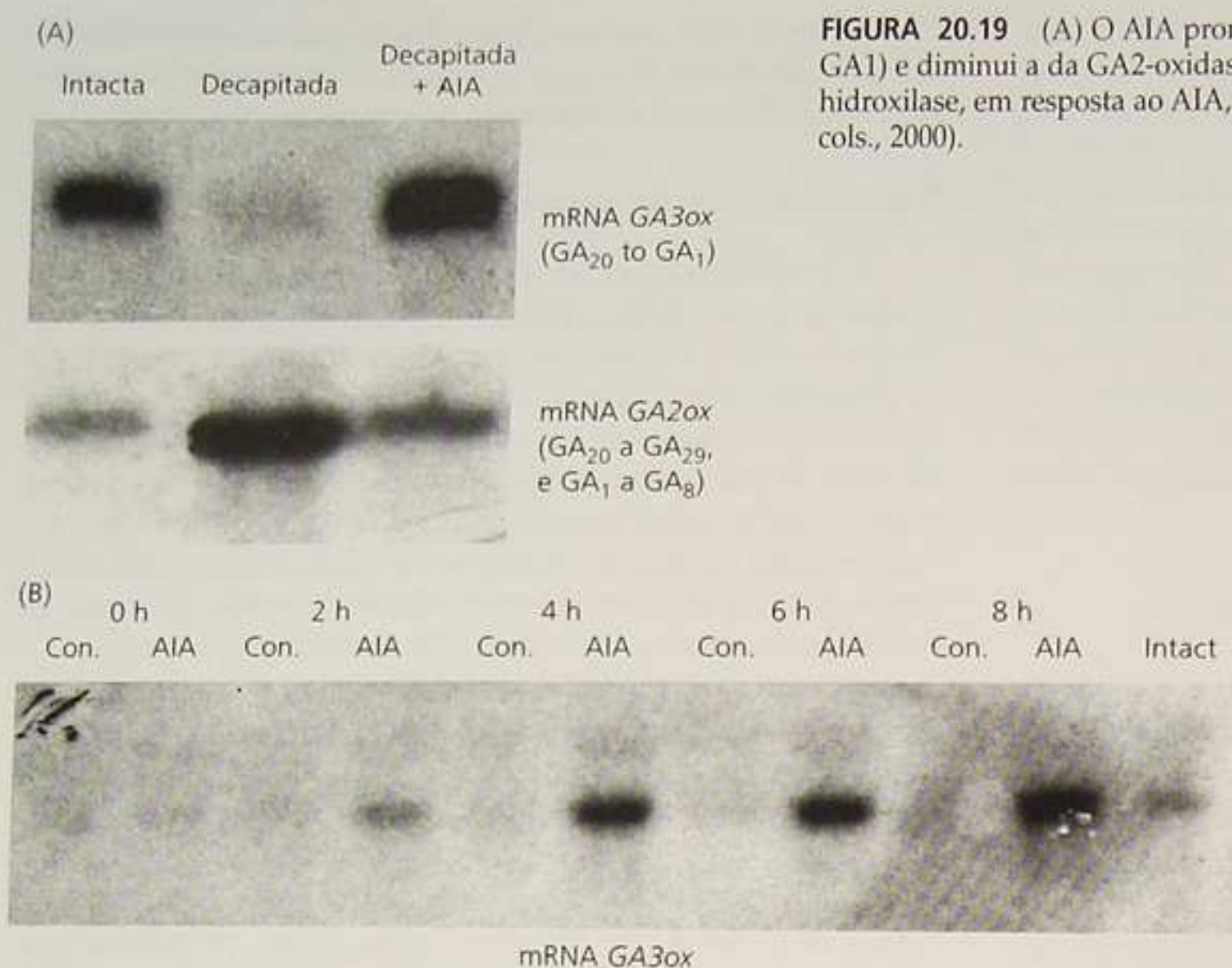



FIGURA 20.19 (A) O AIA promove a transcrição da GA 3β-hidroxilase (formando GA1) e diminui a da GA2-oxidase, a qual degrada a GA_1. (B) O aumento da GA 3β-hidroxilase, em resposta ao AIA, pode ser visto em duas horas. Con = controle (Ross e cols., 2000).

GA20ox ou a GA3ox. Uma estratégia semelhante tem sido recentemente empregada para gramados, mantendo a grama curta sem produção de semente, de modo que cortar a grama pode ser praticamente dispensado — uma vantagem para os proprietários de casas com gramados!

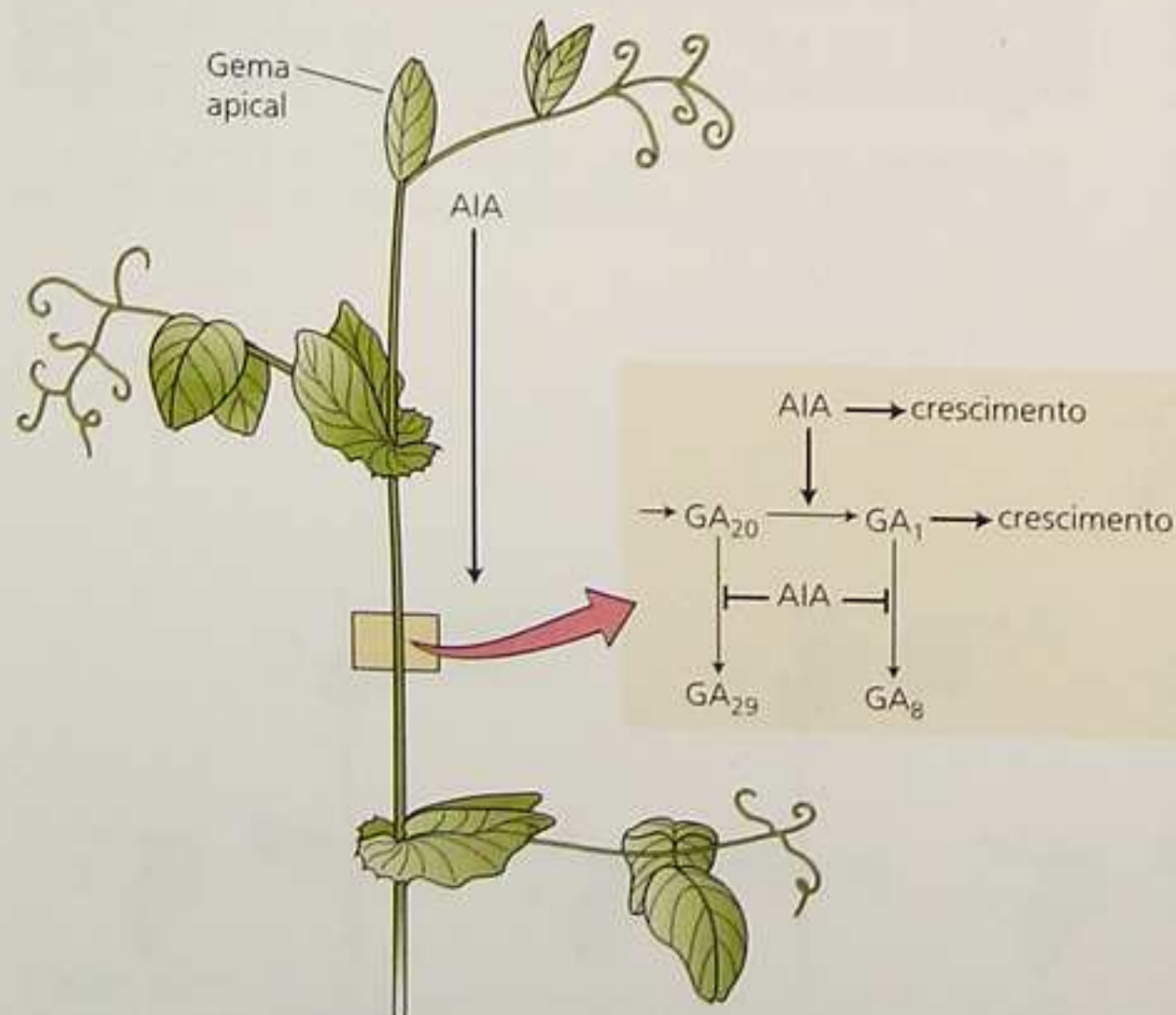



FIGURA 20.20 O AIA (da gema apical) promove e é necessário para a biossíntese do GA_1 nos entrenós inferiores. O AIA também inibe a degradação da GA_1 (Ross e O'Neil, 2001).

MECANISMOS FISIOLÓGICOS DO CRESCIMENTO INDUZIDO POR GIBERELINA

Conforme já tratado, os efeitos da giberelina em promover o crescimento são mais evidentes em plantas anãs e em rosetas. Quando plantas anãs são tratadas com giberelina, elas se assemelham às variedades mais altas da mesma espécie (ver Figura 20.1). Outros exemplos da ação da giberelina incluem o alongamento dos hipocótilos e dos entrenós de gramíneas.

Um exemplo muito particular de alongamento de entrenós é encontrado no arroz irrigado (*Oriza sativa*). Em geral, plantas de arroz estão adaptadas a condições de inundação parcial. Para permitir que as folhas superiores da planta permaneçam acima do nível da água, os entrenós alongam-se à medida que o nível da água sobe. O arroz irrigado apresenta um imenso potencial para o rápido alongamento de entrenós. Sob condições de campo, foram medidas taxas de crescimento de até 25 mm por dia.

O sinal inicial é a pressão parcial reduzida de O_2 resultante da submersão, a qual induz a biossíntese de etileno (ver Capítulo 22). O etileno preso nos tecidos submersos, por sua vez, reduz o nível de ácido abscísico (ver Capítulo 23), o qual age como antagonista da giberelina. O resultado final é que o tecido se torna mais responsivo à giberelina endógena (Kende e cols., 1998). Visto que os inibidores de giberelina bloqueiam o efeito de estimulação do crescimento, tanto pela submersão quanto pelo etileno, e que a giberelina exógena pode estimular o crescimento sem que haja a submersão, parece que a giberelina é o hormônio diretamente responsável pelo estímulo do crescimento.

O crescimento do arroz irrigado estimulado por GA pode ser estudado em um sistema de caule seccionado

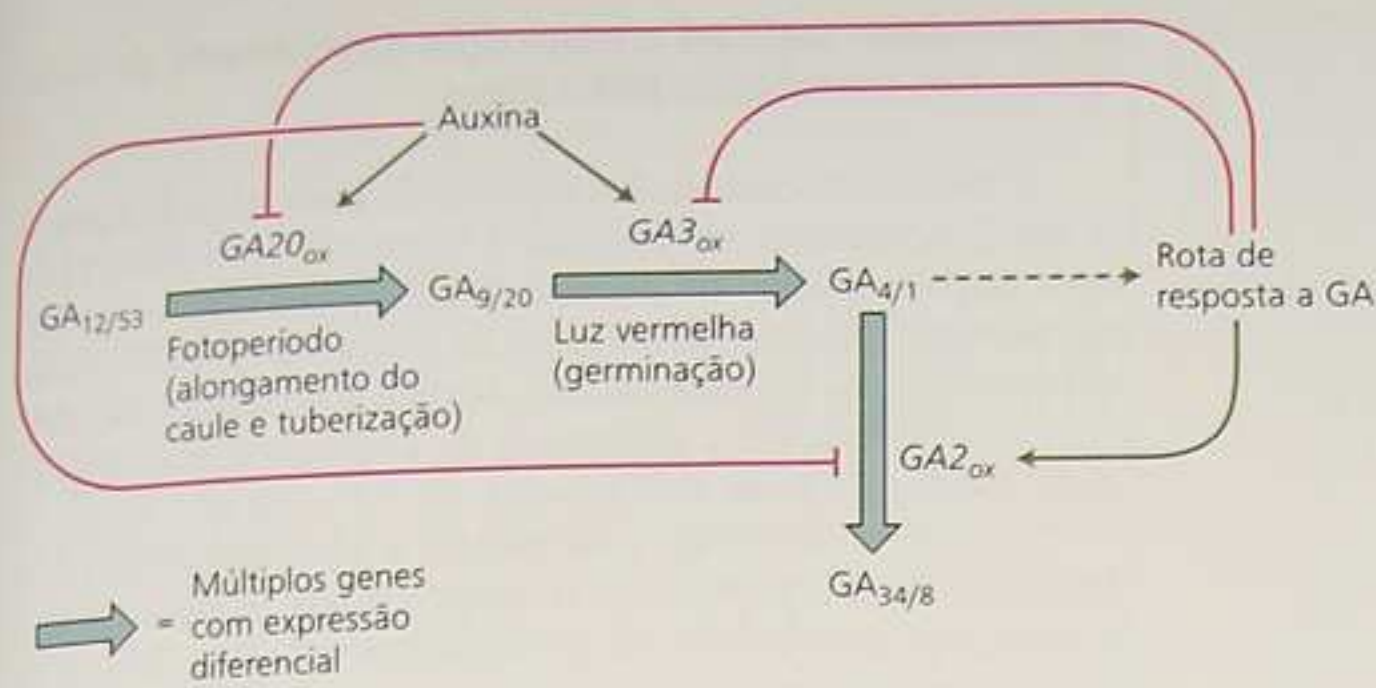



FIGURA 20.21 A rota de biossíntese de giberelina, mostrando as identidades dos genes com as enzimas metabólicas e o modo pelo qual a transcrição desses genes é regulada por *feedback*, pelo ambiente e por outros hormônios endógenos.

(Figura 20.23). A adição de giberelina causa um marcante aumento na taxa de crescimento após um período de 40 minutos. O alongamento celular representa 90% do aumento em comprimento durante as primeiras duas horas do tratamento com giberelina.

As giberelinas estimulam o alongamento e a divisão celulares

O efeito das giberelinas aplicadas a plantas anãs intactas é tão marcante que poderia parecer simples determinar como elas agem. Infelizmente, este não é o caso, pois, conforme foi visto, muito sobre o crescimento celular não está compreendido. Todavia, alguns aspectos do alongamento do caule induzido por giberelina são conhecidos.

A giberelina aumenta tanto o alongamento quanto a divisão celular, conforme evidenciado pelos aumentos do comprimento celular e do número de células, em resposta à aplicação de giberelinas. Por exemplo, os entrenós de plantas altas de ervilha possuem mais células do que aqueles de plantas anãs, além das células serem mais longas. As mitoses aumentam de modo notável na região subapical do meristema de plantas em roseta sob dias longos, após o tratamento com giberelina (Figura 20.24). O estímulo significativo do alongamento do entrenó em arroz irrigado é devido, em parte, ao aumento da divisão celular no meristema intercalar. Além disso, somente as células do meristema intercalar, nas quais a divisão celular é induzida por giberelina, exibem alongamento celular estimulado por este hormônio.

Como o alongamento celular estimulado por giberelina parece preceder a divisão celular induzida, a discussão será iniciada com o papel da giberelina na regulação do alongamento celular.

FIGURA 20.22 Plantas anãs de trigo geneticamente modificadas. A planta de trigo não-transformada está ilustrada no extremo esquerdo. As três plantas à direita foram transformadas com o cDNA de uma giberelina 2-oxidase de feijão, sob o controle de um promotor constitutivo, de modo que o GA_1 endógeno ativo foi degradado. Os vários graus de nanismo refletem os diferentes níveis de superexpressão do gene exógeno (fotografia de Hedden e Phillips, 2000, cedida por Andy Phillips).

As giberelinas aumentam a extensibilidade da parede celular sem acidificação

Conforme discutido no Capítulo 15, a taxa de alongamento pode ser influenciada tanto pela extensibilidade da parede celular quanto pela taxa de absorção de água controlada osmoticamente. A giberelina não apresenta efeito nos parâmetros osmóticos, mas tem sido consistentemente observado que causa um aumento tanto na extensibilidade mecânica das paredes celulares quanto no relaxamento por estresse das paredes das células vivas. Uma análise de genótipos de ervilha, que diferem no conteúdo de giberelina ou na sensibilidade a este hormônio, mostrou que a giberelina diminui a força mínima que causará a extensão da parede (o limiar de cedência da parede) (Behringer e cols., 1990). Assim, giberelina e auxina parecem exercer seus efeitos modificando as propriedades das paredes celulares.

No caso da auxina, o afrouxamento da parede celular parece ser mediado, em parte, pela acidificação da parede (ver Capítulo 19). No entanto, este não parece ser o mecanismo de ação da giberelina. Em nenhum caso um aumento no processo de extrusão de prótons induzido por giberelina foi demonstrado. Por outro lado, a giberelina nunca está presente em tecidos com ausência completa de auxina e os efeitos da giberelina no crescimento podem depender da acidificação da parede celular induzida por auxina.

O *lag time* típico antes do início do crescimento estimulado por giberelina é maior que aquele observado para auxina; como visto anteriormente, esse tempo em arroz irrigado é de aproximadamente 40 minutos (ver Figura 20.23) e em ervilhas, de duas a três horas (Yang e cols., 1996). Estes *lag times* mais longos apontam para um mecanismo de promoção de crescimento distinto daquele da auxina. Consistente com a existência de um mecanismo independente de afrouxamento da parede giberelina-específico, as respostas de crescimento à aplicação de giberelina e auxinas são aditivas.

Várias sugestões têm sido feitas com respeito ao mecanismo de alongamento do caule estimulado por giberelina, todos apre-

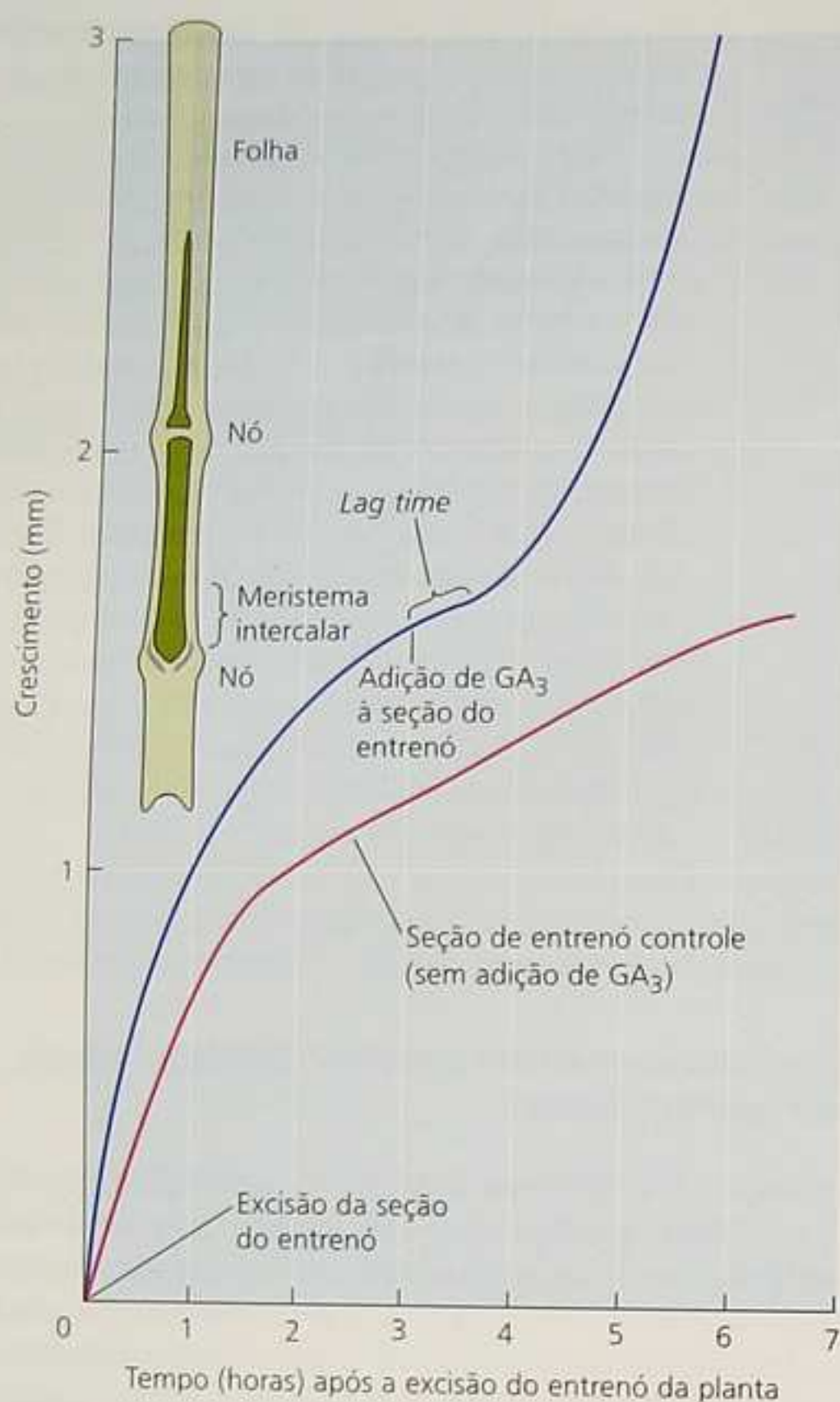



FIGURA 20.23 Registro contínuo do crescimento dos entrenós superiores do arroz irrigado em presença ou ausência de GA_3. O entrenó-controle alonga a uma taxa constante, após um rápido crescimento inicial, durante as primeiras duas horas, após a excisão do segmento. A adição de GA após três horas induziu um pronunciado aumento na taxa de crescimento, após um *lag time* de 40 minutos (curva superior). A diferença nas taxas de crescimento inicial dos dois tratamentos não é significativa, mas reflete uma pequena variação nos materiais experimentais. O detalhe mostra a seção do entrenó do caule da planta de arroz usada no experimento. O meristema intercalar imediatamente acima do nó responde a GA (Sauter e Kende, 1992).

sentando evidências experimentais, embora ainda nenhum tenha fornecido uma resposta clara. Há evidência, por exemplo, de que a enzima xiloglucano endotransglicosilase (XET) está envolvida na extensão da parede promovida por giberelina. A função da XET pode ser facilitar a entrada das expansinas na parede celular (lembre-se de que as expansinas são proteínas da parede celular causadoras do seu afrouxamento em condições de acidez, por enfraquecer as ligações de hidrogênio entre os polissacarídeos [ver Capítulo 15]). Tanto as expansinas quanto a XET podem ser necessárias para o alongamento celular estimulado por giberelina (ver **Tópico 20.3 na Internet**).

As giberelinas regulam a transcrição das quinases do ciclo celular nos meristemas intercalares

A taxa de crescimento dos entrenós do arroz irrigado aumenta significativamente em resposta à submersão, devendo, parte desta resposta resultar do aumento da divisão celular no meristema intercalar. Para estudar o efeito da giberelina no ciclo celular, os pesquisadores isolaram núcleos de células do meristema intercalar e determinaram a quantidade de DNA por núcleo (Figura 20.25) (Sauter e Kende, 1992).

Em plantas induzidas à submersão, a giberelina ativa o ciclo de divisão celular primeiro na transição da fase G_1 para a fase S, ocasionando um aumento na atividade mitótica. Para tanto, a giberelina induz a expressão de genes para várias **proteínas quinases dependentes de ciclina** (CDKs), as quais estão envolvidas na regulação do ciclo celular (ver Capítulo 1). A transcrição destes genes — primeiro aqueles que regulam a transição entre as fases G_1 e S, seguido por aqueles que regulam a transição entre as fases G_2 e M — é induzida nas células do meristema intercalar, pela giberelina. O resultado é um aumento induzido pela giberelina na progressão da fase G_1 para S e, então, para mitose e divisão celular (ver **Tópico 20.4 na Internet**) (Fabian e cols., 2000).

Os mutantes de resposta à giberelina apresentam deficiências na transdução de sinal

Os mutantes de um gene, com deficiência na sua resposta à giberelina, fornecem uma ferramenta valiosa para a identificação de genes que codificam possíveis receptores de giberelina ou componentes das vias de transdução de sinais. Na triagem para tais mutantes, três classes principais de mutações que afetam a altura da planta foram selecionadas:

1. Plantas anãs insensíveis à giberelina.
2. Mutantes deficientes em giberelina, nos quais esta deficiência tem sido superada por uma segunda mutação "supressora", de modo que as plantas assemelham-se às plantas normais.
3. Mutantes com resposta constitutiva à giberelina (mutantes *slender*).

Os três tipos de mutantes foram gerados em *Arabidopsis*, porém mutações equivalentes têm sido encontradas em várias outras espécies; na realidade, algumas têm sido usadas na agricultura por muitos anos.

Os três tipos de mutantes apresentam genes que codificam o mesmo componente da transdução de sinal, independente de os fenótipos selecionados serem completamente diferentes. Isto é possível porque mutações em sítios diferentes na mesma proteína podem produzir vários fenótipos diferentes, dependendo se a mutação é no domínio de regulação ou em um domínio funcional. Alguns exemplos dos diferentes fenótipos que podem resultar de alterações em diferentes sítios na mesma proteína estão descritos nas seções seguintes.

Domínio funcional (repressão). Os principais componentes da via de transdução de sinal da giberelina identificados até agora são *repressores da sinalização de giberelina*; isto significa que eles reprimem o que se chama de crescimento induzido por giberelina e a planta resultante é anã. As proteínas represssoras são anuladas ou inativadas por giberelina, de modo que pode ocorrer o tipo

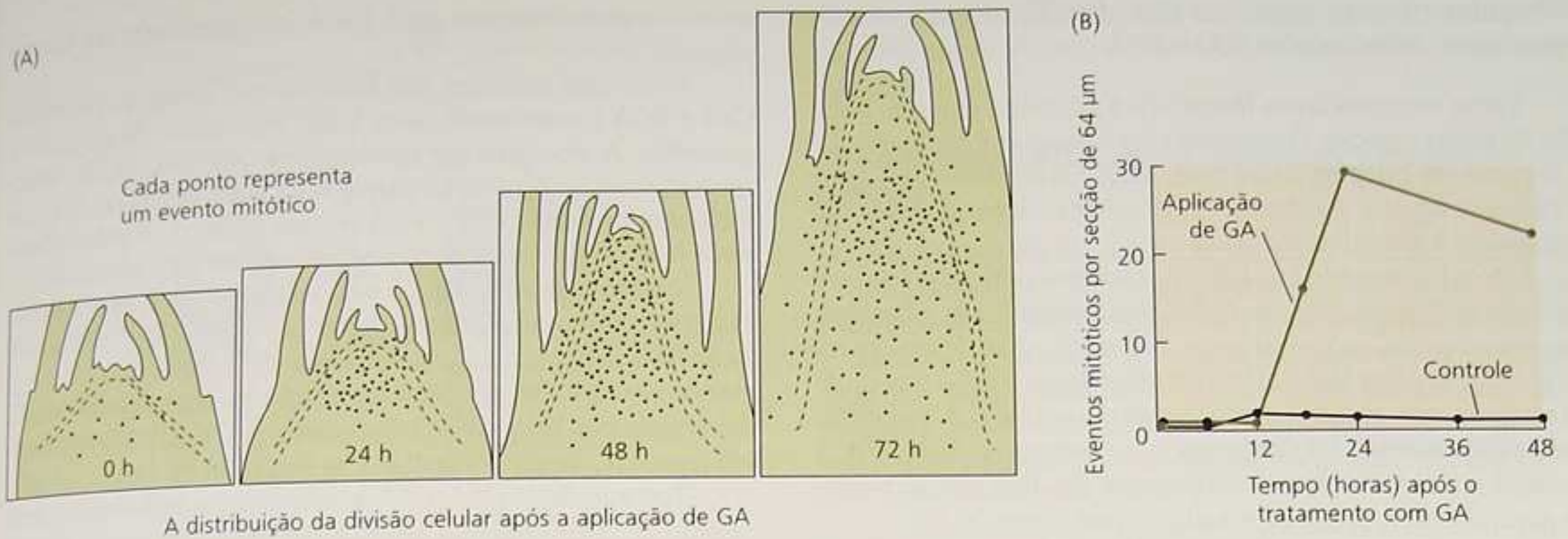



FIGURA 20.24 Aplicações de giberelina em plantas na forma de rosetas induzem o alongamento dos entrenós, em parte por aumentar a divisão celular. (A) Seções longitudinais através do eixo de *Samolus parviflorus* mostram um aumento na divisão celular após a aplicação de GA (cada ponto representa um evento mitótico em uma seção de 64 µm de espessura). (B) O número de eventos mitóticos com e sem GA em ápices caulinares de meimendro (*Hyoscyamus niger*) (Sachs, 1965).

padrão de crescimento considerado alto. A perda de função, resultante de uma mutação no domínio funcional de um *regulador negativo*, resulta no mutante que parece ter sido tratado com giberelina; isto é, apresenta o fenótipo alto. Assim, uma mutação de perda de função de um regulador negativo é como uma dupla negativa na língua inglesa: torna-se positiva.

Devido aos efeitos dessas mutações de perda de função serem pleiotrópicos — ou seja, elas afetam outros processos do desenvolvimento além do alongamento do caule — as etapas da rota envolvida na resposta de crescimento são provavelmente comuns a todas as resposta à giberelina.

Domínio de regulação. Se uma mutação no gene para o mesmo regulador negativo leva a uma mudança no *domínio de regulação* (i. é, a parte da proteína que recebe um sinal do receptor da giberelina, indicando a presença deste hormônio), a proteína é incapaz de receber o sinal e mantém sua atividade de repressão do crescimento. O fenótipo de tal mutante seria o de uma planta anã insensível à giberelina. Assim, diferentes mutações no mesmo gene podem originar fenótipos opostos (alto *versus* anão), dependendo se a mutação ocorreu no domínio de repressão ou no de regulação.

As mutações no domínio de regulação que conferem a perda da sensibilidade à giberelina resultam na síntese de uma forma constitutivamente ativa do repressor, que não pode ser inativada pela giberelina. Quanto mais deste tipo de mutante repressor estiver presente na célula, menor será a planta. Conseqüentemente, tais mutações no domínio de regulação são semidominantes.

Por outro lado, as mutações no domínio de repressão inativam o regulador negativo (i. é, elas agem como alelos "nocaute") e não reprimem mais o crescimento; tais mutações são recessivas porque, em um heterozigoto, metade das proteínas será capaz de reprimir o crescimento em ausência de giberelina. *Todos* os reguladores negativos têm que ser não-funcionais para a planta crescer sem giberelina.

Com base nesses conhecimentos, serão examinados exemplos específicos de mutações em genes que codificam proteínas na via de transdução de sinal da giberelina.

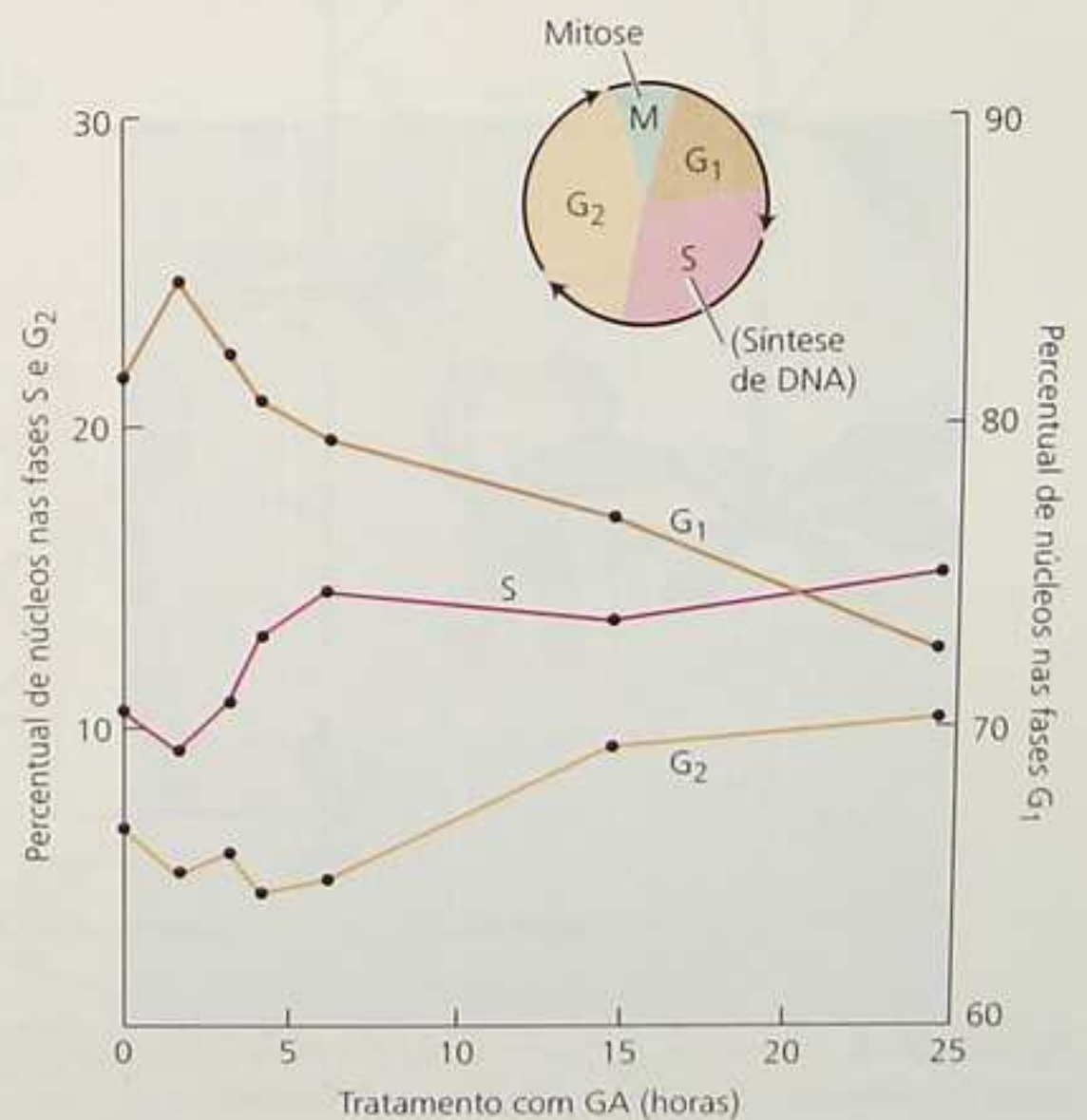



FIGURA 20.25 Mudanças no ciclo celular de núcleos do meristema intercalar de entrenós de plantas de arroz irrigado tratadas com GA_3. Observe que a escala para núcleos em G_1 está à direita do gráfico (Sauter e Kende, 1992).

Diferentes triagens genéticas têm identificado os repressores relacionados GAI e RGA

Vários mutantes anões insensíveis a giberelina têm sido isolados de várias espécies. O primeiro a ser isolado em *Arabidopsis* foi o mutante *gai-1* (Figura 20.26) (Sun, 2000). Os mutantes *gai-1* assemelham-se àqueles deficientes em giberelina, exceto que eles não respondem à giberelina exógena.

Um outro mutante foi obtido por triagem para uma segunda mutação em um mutante de *Arabidopsis* deficiente em giberelina, que restaura, total ou parcialmente, o tipo selvagem de crescimento. O mutante original deficiente em giberelina é o *ga1-3* e a segunda mutação que "resgata" parcialmente o fenótipo (i. é, restaura o crescimento normal) foi denominada *rga* (repressor de *ga1-3*)[4]. A mutação *rga* é recessiva, quando presente em duas cópias, resulta em uma planta de altura intermediária (ver Figura 20.26).

Apesar de os fenótipos contrastantes dos mutantes, os genes tipo selvagem *GAI* e *RGA* são relacionados, com uma identidade de seqüências muito alta (82%). A mutação *gai-1* é semidominante, assim como as mutações, anãs giberelina-insensíveis, em outras espécies.

As análises genéticas têm indicado que ambas as proteínas GAI e RGA normalmente agem como repressores da resposta à giberelina. A giberelina age indiretamente por meio de um intermediário sinalizador, o qual parece se ligar aos domínios de regulação das proteínas GAI e RGA (Figura 20.27). O repressor não pode mais inibir o crescimento, resultando em uma planta alta.

A razão pela qual *gai-1* é anã, enquanto *rga* é alta, é que a mutação ocorreu em diferentes partes da proteína. Enquanto a mutação *gai-1* (a qual anula a sensibilidade do repressor à giberelina) está no domínio de regulação, a mutação *rga* (que impede a ação do repressor no bloqueio do crescimento) está localizada no domínio repressor, conforme ilustrado na Figura 20.28.

O gene mutante *gai-1* codifica uma proteína mutante com uma deleção de 17 aminoácidos, os quais correspondem ao domínio de regulação do repressor (Dill e cols., 2001). Uma mutação similar no domínio receptor do gene *RGA* também produz uma planta anã, insensível à giberelina, demonstrando que as duas proteínas relacionadas apresentam superposição de funções. Devido a tal deleção no mutante *gai-1*, a ação do repressor não pode ser atenuada pela giberelina e o crescimento é constitutivamente inibido.

As giberelinas causam a degradação de repressores da transcrição de RGA

Os genes tipo selvagem *GAI* e *RGA* de *Arabidopsis* integram uma grande família que codifica repressores de transcrição, os quais apresentam regiões com sinais de localização nuclear altamente conservadas. Para demonstrar a localização nuclear e a natureza de repressor do produto do RGA, o promotor RGA foi fusionado com o gene para a proteína verde fluorescente, cujo produto pode ser visualizado por microscopia. A cor verde pode ser vista em núcleos celulares.

Quando as plantas foram tratadas com giberelina, não houve cor verde, indicando que a proteína RGA não estava presente após o tratamento com giberelina. No entanto, quando o conteúdo de giberelina foi severamente diminuído por tratamento com paclobutrazol, um inibidor da biossíntese de giberelina, os núcleos exibiram uma intensa fluorescência verde, demonstrando a presença e a localização nuclear da proteína RGA somente quando a giberelina estava ausente ou em baixa concentração (Figura 20.29) (Silverstone e cols., 2001).

Tanto GAI quanto RGA apresentam uma região conservada na porção amino-terminal da proteína referida como DELLA, com referência ao código para os aminoácidos nessa seqüência. A região está envolvida na resposta à giberelina, pois é o local da mutação *gai-1* que confere a insensibilidade à giberelina. A proteína RGA é sintetizada constantemente; na presença de giberelina, essa proteína é degradada e a região DELLA é necessária para essa resposta (Dill e cols., 2001).

É provável que a giberelina também realize a reciclagem da GAI. O *RGA* e o *GAI* apresentam funções parcialmente redundantes quanto à manutenção do estado reprimido da rota de sinalização da giberelina. Entretanto, o *RGA* parece exercer um papel mais dominante do que o *GAI*, visto

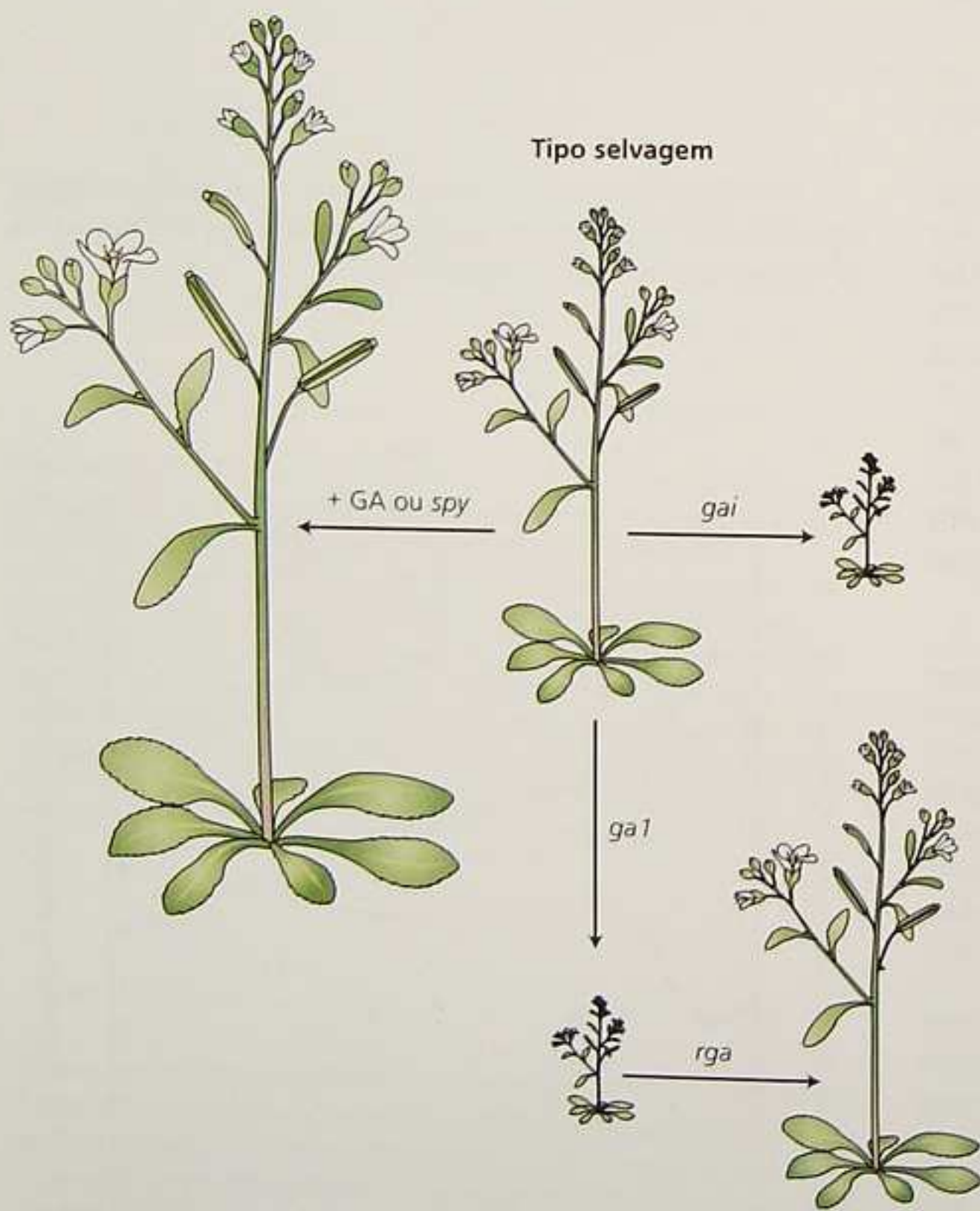



FIGURA 20.26 Os efeitos do tratamento de giberelina e das mutações em três genes diferentes (*gai*, *ga1* e *rga*) no fenótipo de *Arabidopsis*.

[4]Deve-se cuidar para não confundir *gai* (insensível à giberelina) e *ga1* (giberelina — deficiente #1), os quais têm grafia semelhante.

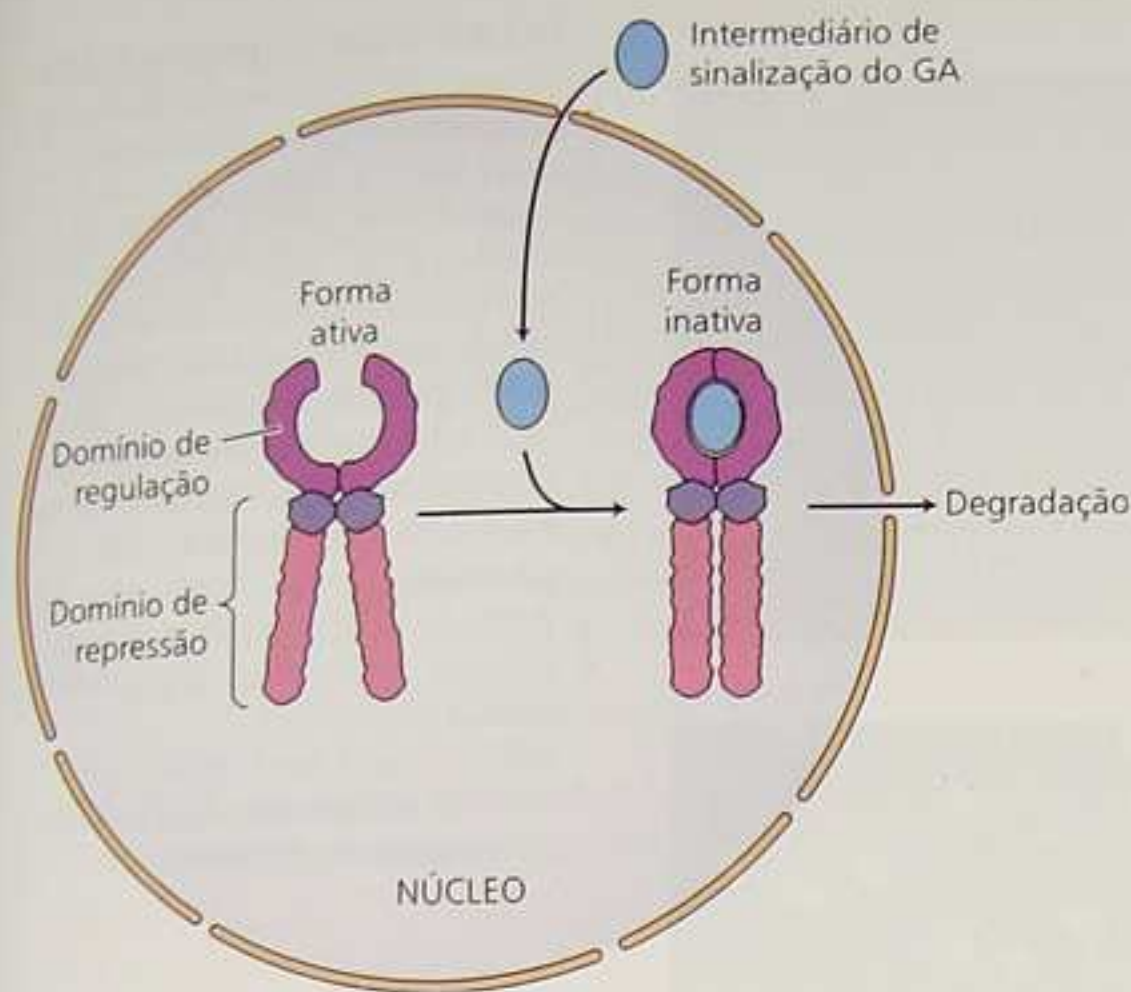



FIGURA 20.27 Os dois domínios funcionais de GAI e RGA: domínio de regulação e domínio de repressão. O domínio de repressão é ativo na ausência de giberelina. Um intermediário de sinalização induzido por giberelina liga-se ao domínio de regulação, tornando-o alvo para destruição. Observe que a proteína forma homodímeros.

que em um mutante deficiente em giberelina, uma segunda mutação no domínio repressor de *gai* (*gai-t6*) não restaura o crescimento, enquanto que uma mutação comparável em *rga* restaura. Por outro lado, a ocorrência de mutações nos domínios repressores de ambos os genes permite a expressão completa de muitas características induzidas por GA, incluindo a altura da planta em ausência de giberelina (Figura 20.26) (Dill e Sun, 2001; King e cols., 2001).

Os repressores DELLA foram identificados em plantas cultivadas

Os repressores funcionais DELLA têm sido descobertos em várias plantas cultivadas que apresentam mutação de nanismo, análogas a *gai-1*, nos genes que codificam tais proteínas. As mais notáveis são as mutações *rht* (altura reduzida, do inglês *r*educed *h*eigh*t*) de trigo, utilizadas na agricultura há 30 anos. Esses alelos codificam moduladores da resposta à giberelina que não apresentam resposta à giberelina, ocasionando o naninsmo (Peng e cols., 1999; Silverstone e Sun, 2000).

Plantas anãs de cereais, como estas, são extremamente importantes como base para a revolução verde, que permitiu a obtenção de grandes aumentos na produção. Cereais normais crescem muito quando juntos em uma plantação, especialmente com altos níveis de fertilizantes, o que resulta no dobramento das hastes (acamamento), com conseqüente decréscimo da produção. O uso dessas variedades anãs com hastes rígidas, que resistem ao acamamento, permite produções maiores.

O regulador negativo SPINDLY é uma enzima que altera a atividade da proteína

Os mutantes *slender* assemelham-se às plantas com fenótipo do tipo selvagem que tenham sido repetidamente tratadas com giberelina. Elas exibem entrenós alongados, crescimento de frutos partenocárpicos (sem sementes, em dicotiledôneas) e pequena produção de pólen. Os mutantes *slender* são raros quando comparados aos mutantes anões.

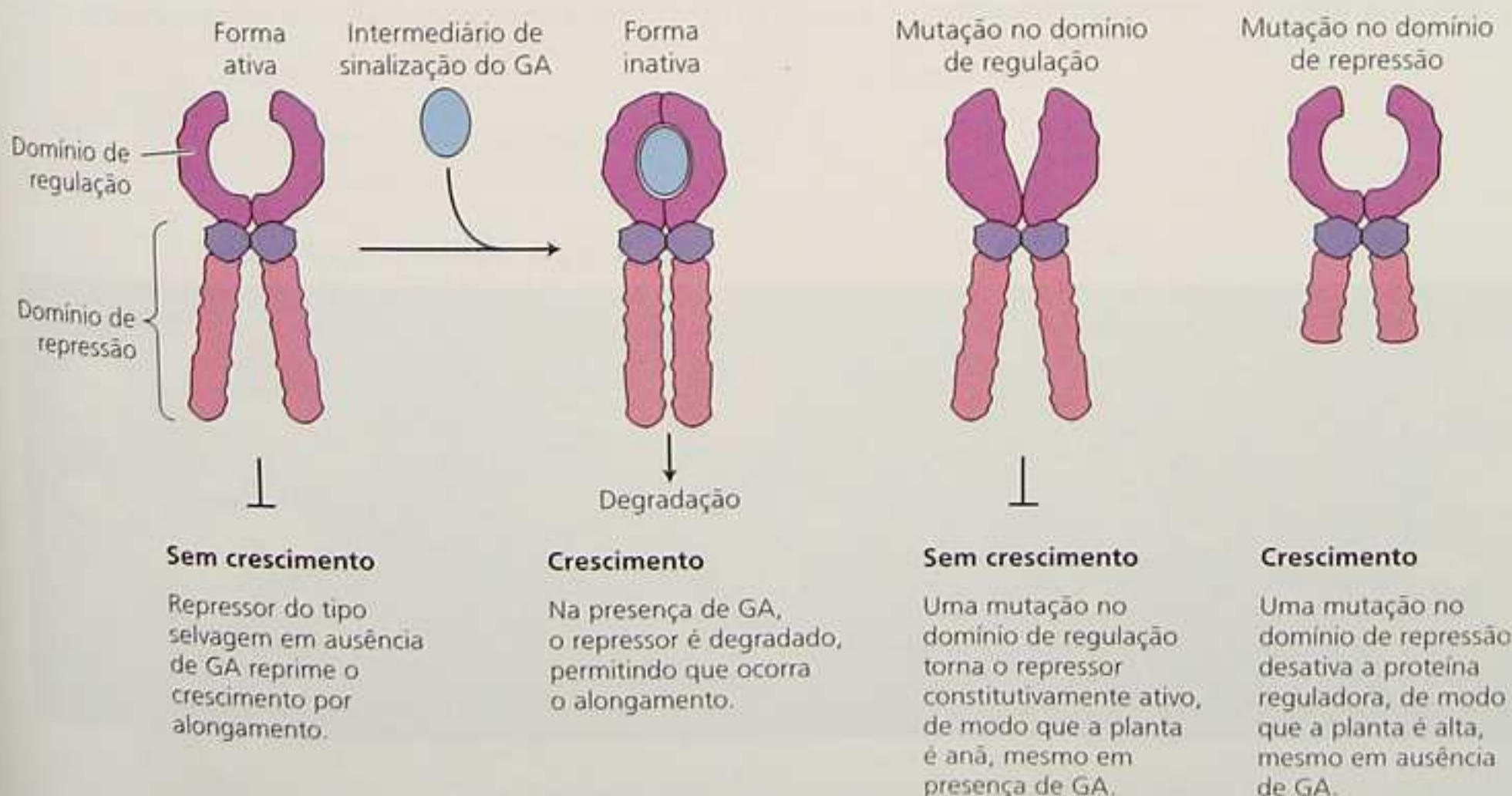



FIGURA 20.28 Diferentes mutações nos repressores GAI e RGA podem apresentar efeitos diferentes no crescimento.

(B)

(A)

+ GA
2 h

48 h
+
Paclobutrazol

RGA GFP RGA
Construção de DNA Promotor

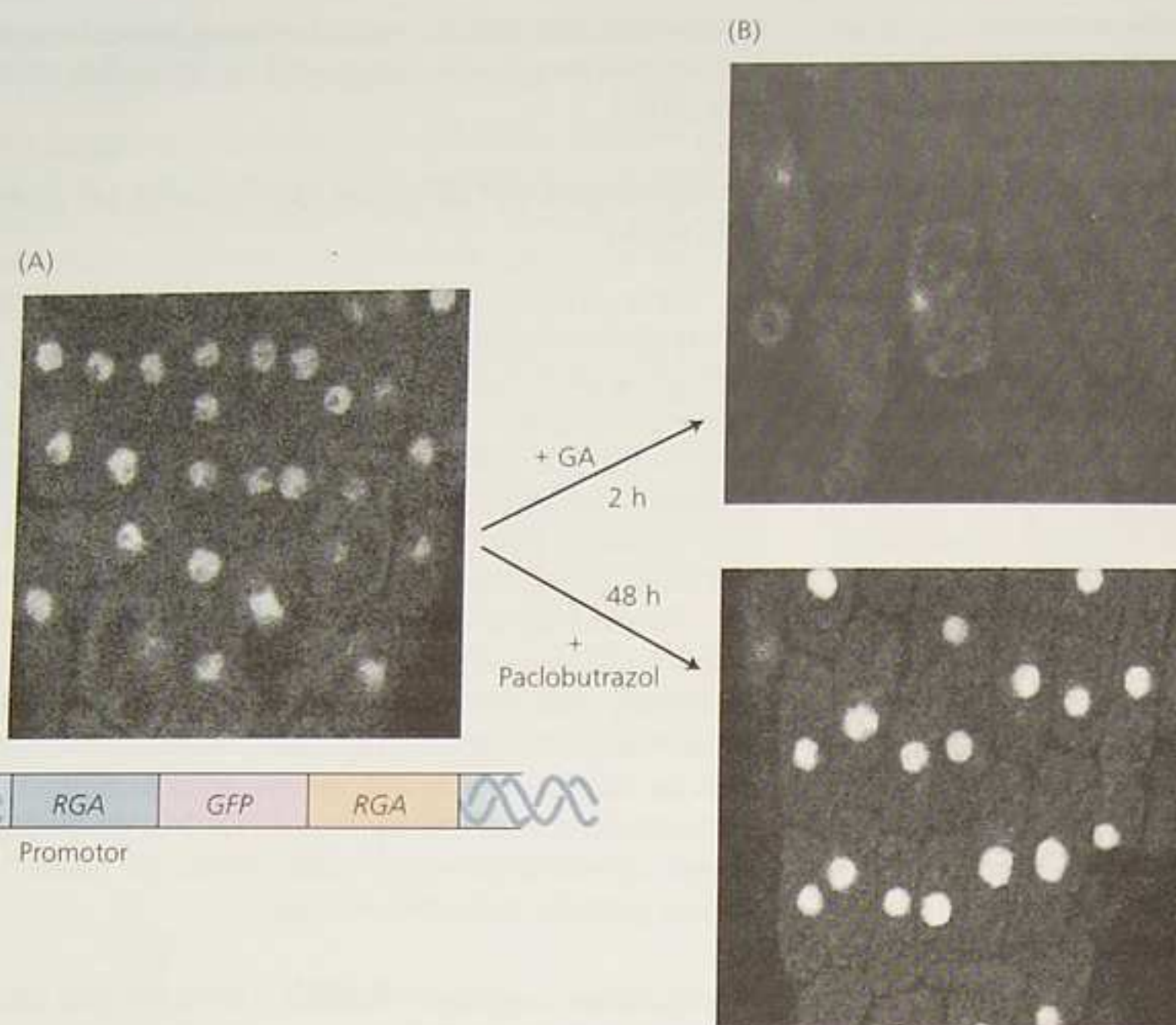



FIGURA 20.29 A proteína RGA é encontrada no núcleo da célula, consistente com sua identidade como fator de transcrição e seu nível é afetado pelo de GA. (A) Células vegetais foram transformadas com o gene para RGA fusionado ao gene para a proteína verde fluorescente (GFP), permitindo a detecção de RGA no núcleo por microscopia de fluorescência. (B) O efeito de GA no RGA. Um pré-tratamento com giberelina por duas horas causa a perda de RGA pela célula (acima). Quando a biossíntese de giberelina é inibida na presença de paclobutrazol, a quantidade de RGA no núcleo aumenta (abaixo) (Silverstone e cols., 2001).

Uma possível explicação para o fenótipo *slender* poderia ser simplesmente que tais mutantes apresentam níveis endógenos de giberelinas maiores do que o normal. Por exemplo, na mutação *sln* de ervilhas, a etapa de desativação da giberelina é bloqueada na semente. Como resultado, a semente madura, a qual, no tipo selvagem, contém pouco ou nenhum GA, apresenta níveis extremamente altos (anormais) de GA_{20}. Então, o GA_{20} da semente é absorvido pela plântula e convertido em GA_1 bioativa, originando o fenótipo *slender*. No entanto, uma vez que a plântula consuma o GA_{20} na semente, o fenótipo retorna ao normal (Reid e Howell, 1995).

Se, por outro lado, o fenótipo *slender* não é devido a uma superprodução de giberelina endógena, o mutante é considerado um **mutante de resposta constitutiva** (Sun, 2000). Os mutantes com melhor caracterização neste tipo são os mutantes ultra-altos: *la cry^s* em ervilhas (representando mutações nos dois *loci*: *La* e *Cry^s*) (ver Figura 20.10); *procera* (*pro*) em tomate; *slender* (*sln*) em cevada e *spin-*

Tipo selvagem ga1 ga1/spy spy

FIGURA 20.30 A mutação *spy* em *Arabidopsis* inativa de um repressor do crescimento, de maneira que a planta parece ter sido tratada com giberelina. Da esquerda para a direita: tipo selvagem, *ga1* (GA-deficiente), mutante duplo *ga1/spy* e *spy* (cedida por N. Olszewski).

GA age bloqueando as ações dos genes SPY, GAI e RGA

SPY: também um repressor negativo; aumenta o efeito de GAI e RGA

GAI/RGA: agem na ausência de GA, suprimindo o crescimento

– O-GlcNAc transferase: envolvida na modificação da proteína

– fatores de transcrição

Transcrição do mRNA, ocasionando o crescimento

Crescimento

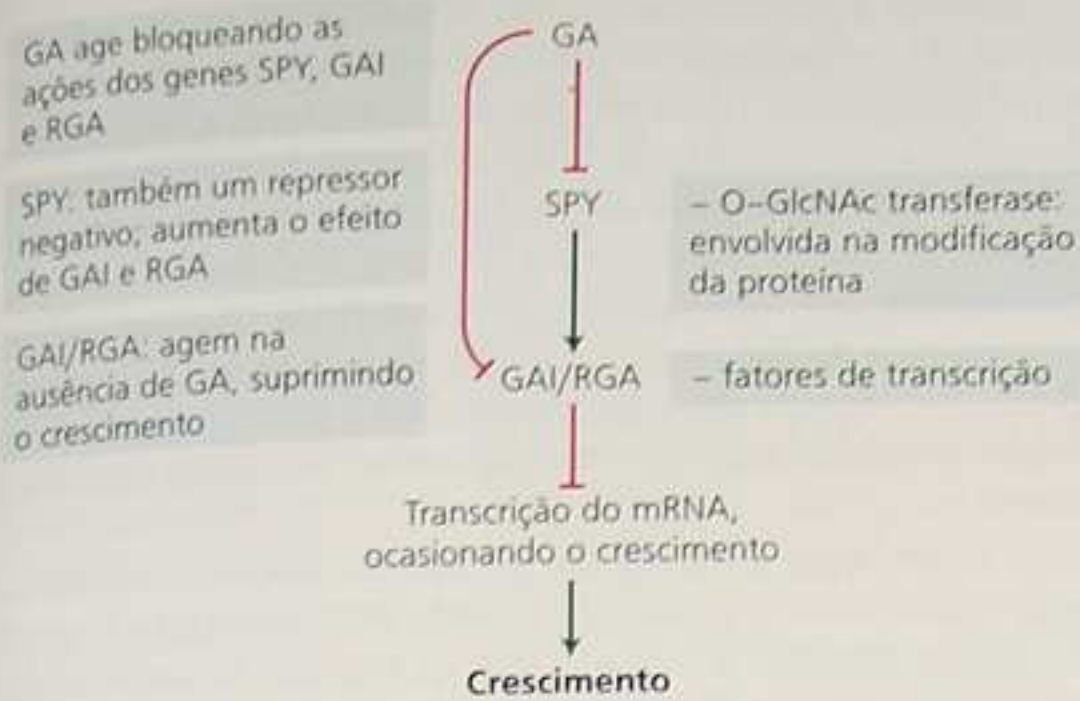



FIGURA 20.31 Interações entre a giberelina e os genes *SPY, GAI* e *RGA* na regulação do alongamento do caule.

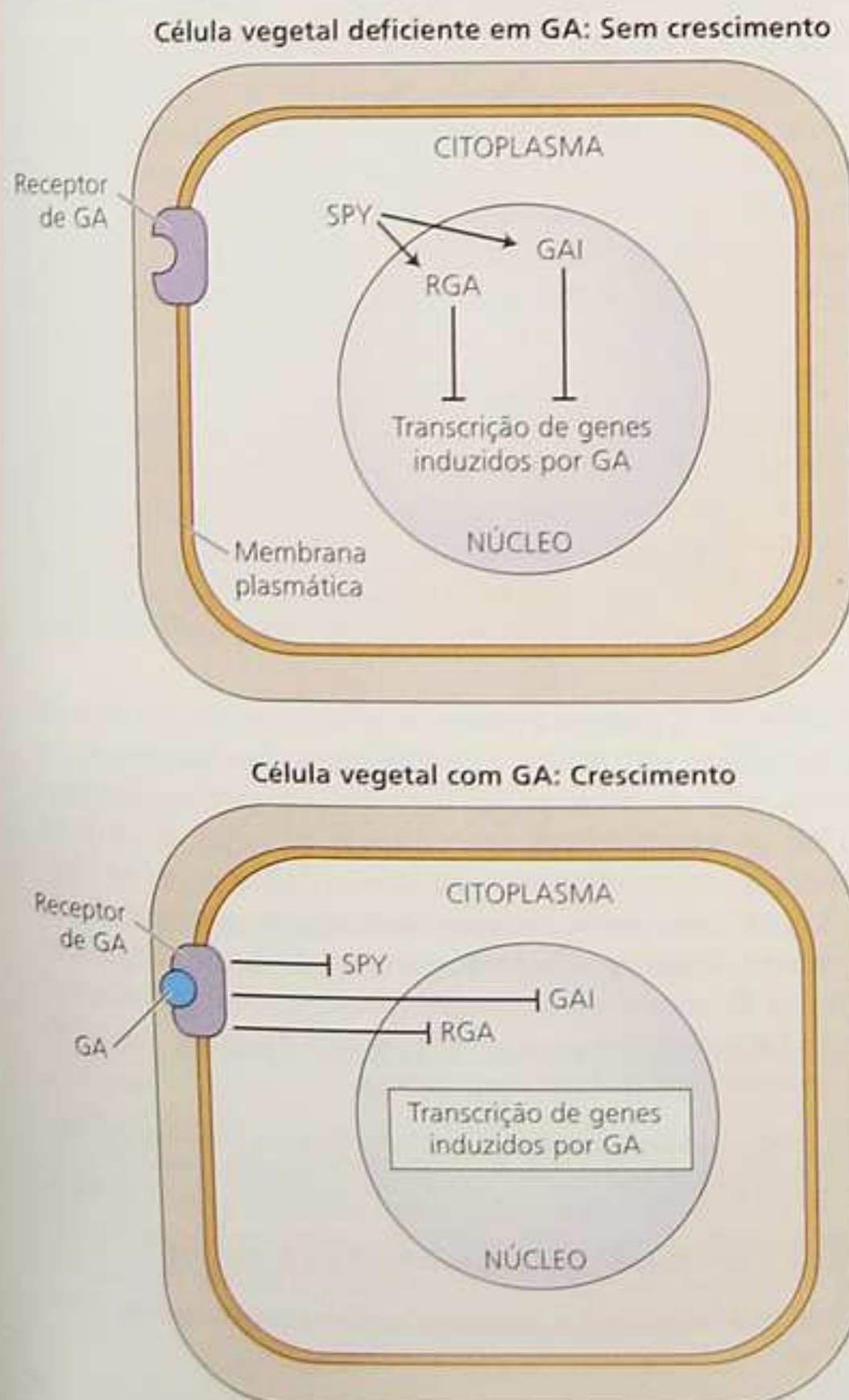
dly (*spy*) em *Arabidopsis* (Figura 20.30). Todas essas mutações são recessivas e parecem ser mutações de perda de função nos reguladores negativos da rota de resposta à giberelina, como no caso dos reguladores DELLA.

O gene *SPINDLY* em *Arabidopsis* e os genes relacionados em outras espécies apresentam seqüências similares aos genes que codificam as glicosamina transferases em animais (Thornton e cols., 1999). Tais enzimas modificam direta ou indiretamente a atividade da proteína, por interferir ou bloquear os sítios de fosforilação pelas quinases. A proteína-alvo das proteínas *spindly* ainda não foi identificada.

SPY age *upstream* de *GAI* e *RGA* na cadeia de transdução de sinal de giberelina

Com base na evidência apresentada nas seções anteriores e em outros estudos da expressão de *SPY, GAI* e *RGA* (Sun, 2000; Dill e cols., 2001), pode-se iniciar o esboço dos seguintes elementos da cadeia de transdução de sinal de giberelina (Figuras 20.31 e 20.32):

- Dois ou mais reguladores de transcrição codificados por *GAI* e *RGA* agem como inibidores de transcrição de genes que direta ou indiretamente promovem o crescimento.
- SPY parece ser a proteína intermediária da transdução de sinal que age *upstream* de GAI e RGA, e que ativa ou aumenta a transcrição ou a ação de GAI e RGA ou de outro regulador negativo.

Célula vegetal deficiente em GA: Sem crescimento

Em uma célula deficiente em GA, de um mutante para a biossíntese de GA ou um tipo selvagem sem o sinal de GA, o receptor transmembrana de giberelina é inativo em ausência do sinal de GA. Neste caso, a SPY é uma O-GlcNAc transferase ativa que catalisa a adição de um resíduo sinal GlcNAc (a partir da UDP-GlcNAc) via uma ligação O a um resíduo específico de serina e/ou treonina das proteínas alvo, possivelmente RGA e GAI. As proteínas RGA e GAI ativas agem como repressores da transcrição e inibem, direta ou indiretamente, a expressão dos genes induzidos por GA.

Célula vegetal com GA: Crescimento

Na presença de giberelina, o receptor de GA é ativado pela ligação ao GA bioativo. O sinal de GA inibe os repressores de RGA e GAI diretamente e por desativar SPY. Na ausência de repressão por RGA e GAI, os genes induzidos por GA são transcritos.

FIGURA 20.32 Funções propostas para as proteínas SPY, GAI e RGA, na rota de sinalização de GA na célula vegetal.

- Na presença de giberelina, *SPY, GAI* e *RGA* são inativados ou desligados.
- A proteína RGA é degradada, sendo provável que a GAI venha a ser similarmente destruída.

Ainda está sob investigação se a giberelina anula os genes *GAI* e *RGA* por intermédio da *SPY* ou independentemente ou de ambas as maneiras. No entanto, neste caso e naqueles como do etileno (ver Capítulo 22) e do fotorreceptor fitocromo (ver Capítulo 17), a mensagem do programa-padrão do desenvolvimento é para que ocorra o tipo induzido de crescimento, mas essa rota-padrão é inibida pela presença de vários reguladores negativos. Mais do que promover diretamente um efeito, a chegada de um sinal de desenvolvimento — neste caso a giberelina — anula o repressor de crescimento, possibilitando o desenvolvimento da condição-padrão.

TRANSDUÇÃO DE SINAL DE GIBERELINA: A CAMADA DE ALEURONA DE CEREAIS

As análises genéticas do crescimento regulado por giberelina, como os estudos descritos na seção anterior, têm identificado alguns dos genes e seus produtos, mas não as rotas bioquímicas envolvidas na transdução de sinal de giberelina. Os mecanismos bioquímicos e moleculares que são provavelmente comuns a todas as respostas à giberelina têm sido estudados mais detalhadamente em relação à síntese e secreção da α-amilase estimulada por giberelina, nas camadas de aleurona de cereais (Jacobsen e cols., 1995).

Nesta seção, será descrito como esses estudos têm esclarecido a localização do receptor de giberelina, a regulação transcricional dos genes para α-amilase e outras proteínas, bem como a possível rota de transdução de sinal envolvida no controle da síntese e secreção da α-amilase por giberelina.

A giberelina do embrião induz a produção de α-amilase pela camada de aleurona

Os grãos de cereais (*cariopses*) podem ser divididos em três partes: o embrião diplóide, o endosperma triplóide e o pericarpo fusionado à testa (testa da semente-parede do fruto). A parte do embrião consiste no embrião propriamente dito, junto com seu órgão especializado em absorção, o escutelo, cujas funções são absorver as reservas solubilizadas do endosperma e transportar essas reservas ao embrião. O endosperma é composto de dois tecidos: o endosperma amiláceo, localizado centralmente e a camada de aleurona (Figura 20.33A).

O endosperma amiláceo, tipicamente um tecido morto na maturidade, consiste de células com paredes celulares finas, preenchidas com grãos de amido. A camada de aleurona circunda esse endosperma e é citológica e bioquimicamente diferente dele. As células de aleurona apresentam paredes celulares espessas e contêm um grande número de vacúolos que armazenam proteínas, denominados *corpos protéicos* (Figura 20.33B-D), delimitados por uma membrana única. Esses corpos protéicos também contêm fitina, uma mistura de sais catiônicos (principalmente Mg^{+2} e K^{+}) do ácido *mio*-inositol-hexafosfórico (ácido fítico).

Durante a germinação e o crescimento inicial da plântula, as reservas do endosperma — principalmente amido e proteína — são hidrolisadas por várias enzimas hidrolíticas e os açúcares solubilizados, os aminoácidos e outros produtos são transportados para o embrião em crescimento. As duas enzimas responsáveis pela degradação do amido são a α- e a β-amilase. A α-amilase hidrolisa internamente as cadeias de amido, produzindo oligossacarídeos que consistem de resíduos de glicose com ligação α-1,4, enquanto a β-amilase degrada esses oligossacarídeos a partir das extremidades para produzir maltose, um dissacarídeo. A maltase converte a maltose em glicose.

A α-amilase é secretada no endosperma amiláceo das sementes de cereais tanto pelo escutelo quanto pela camada de aleurona (ver Figura 20.33A). A única função da camada de aleurona das sementes de monocotiledôneas (p. ex., cevada, trigo, arroz, centeio e aveia) parece ser a síntese e a secreção de enzimas hidrolíticas. Após realizar essa função, as células de aleurona entram no processo de morte programada.

Os experimentos realizados na década de 1960 confirmaram a observação original de Gottlieb Haberlandt, em 1890, na qual a secreção de enzimas de degradação de amido pela camada de aleurona de cevada dependia da presença do embrião. Quando o embrião era removido (i. é, as sementes eram desembrionadas), o amido não era degradado. No entanto, se a metade de uma semente sem embrião era posicionada na proximidade de um embrião excisado, o amido era digerido, demonstrando que o embrião produz uma substância que se difunde e desencadeia a liberação da α-amilase pela camada de aleurona.

Foi logo descoberto que a giberelina (GA_3) poderia substituir a presença do embrião no estímulo da degradação do amido. Quando as metades de sementes desembrionadas foram incubadas em soluções tamponadas contendo ácido giberélico, a secreção de α-amilase no meio foi muito estimulada após um período de oito horas (relativo às metades de sementes-controle, incubadas sem ácido giberélico).

O significado do efeito da giberelina tornou-se claro quando foi demonstrado que o embrião sintetiza e libera giberelina (principalmente GA_1) no endosperma durante a germinação. Assim, o embrião de cereais regula com eficiência a mobilização de suas próprias reservas, por meio da secreção de giberelinas, que estimulam a função digestiva da camada de aleurona (ver Figura 20.33A).

A giberelina promove a produção e/ou secreção de várias enzimas hidrolíticas envolvidas na solubilização das reservas do endosperma, entre as quais, principalmente, a α-amilase. Desde os anos 1960 os pesquisadores têm utilizado camadas de aleurona isoladas ou mesmo protoplastos das células de aleurona (ver Figura 20.33 C e D) em vez de metades de sementes (ver Figura 20.33 B). A camada de aleurona isolada, que consiste de uma população homogênea de células-alvo, fornece uma oportunidade singular para estudar os aspectos moleculares da ação da giberelina na ausência de tipos celulares não-responsivos.

Na discussão seguinte sobre a produção da α-amilase induzida por giberelina, o foco estará sobre três questões:

1. Como a giberelina regula ao aumento da α-amilase?
2. Onde está localizado o receptor de giberelina na célula?

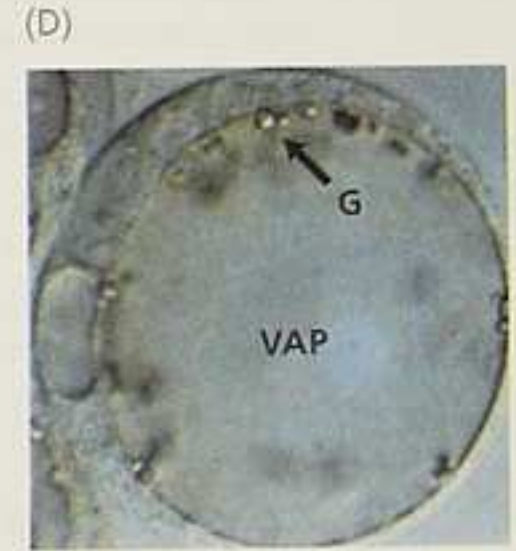
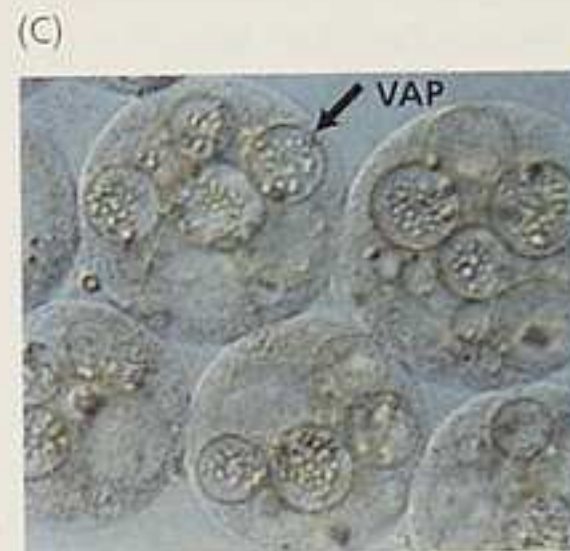
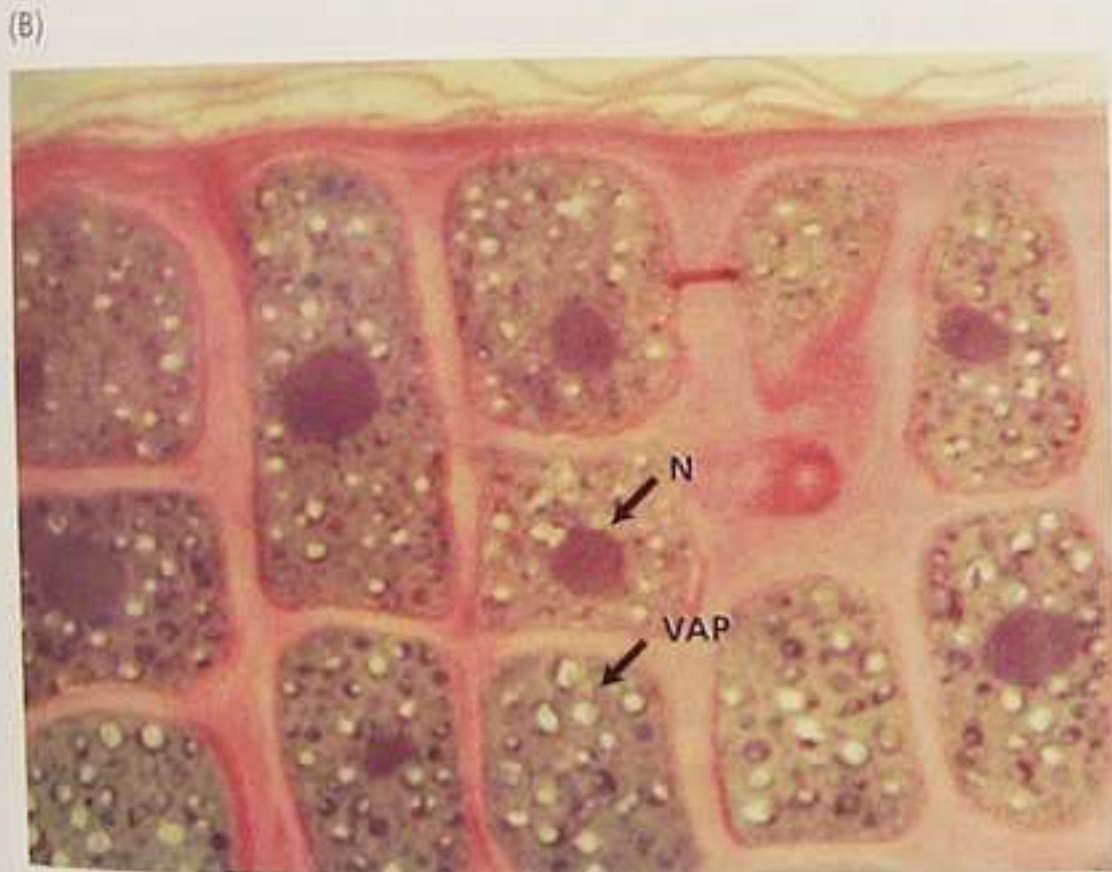
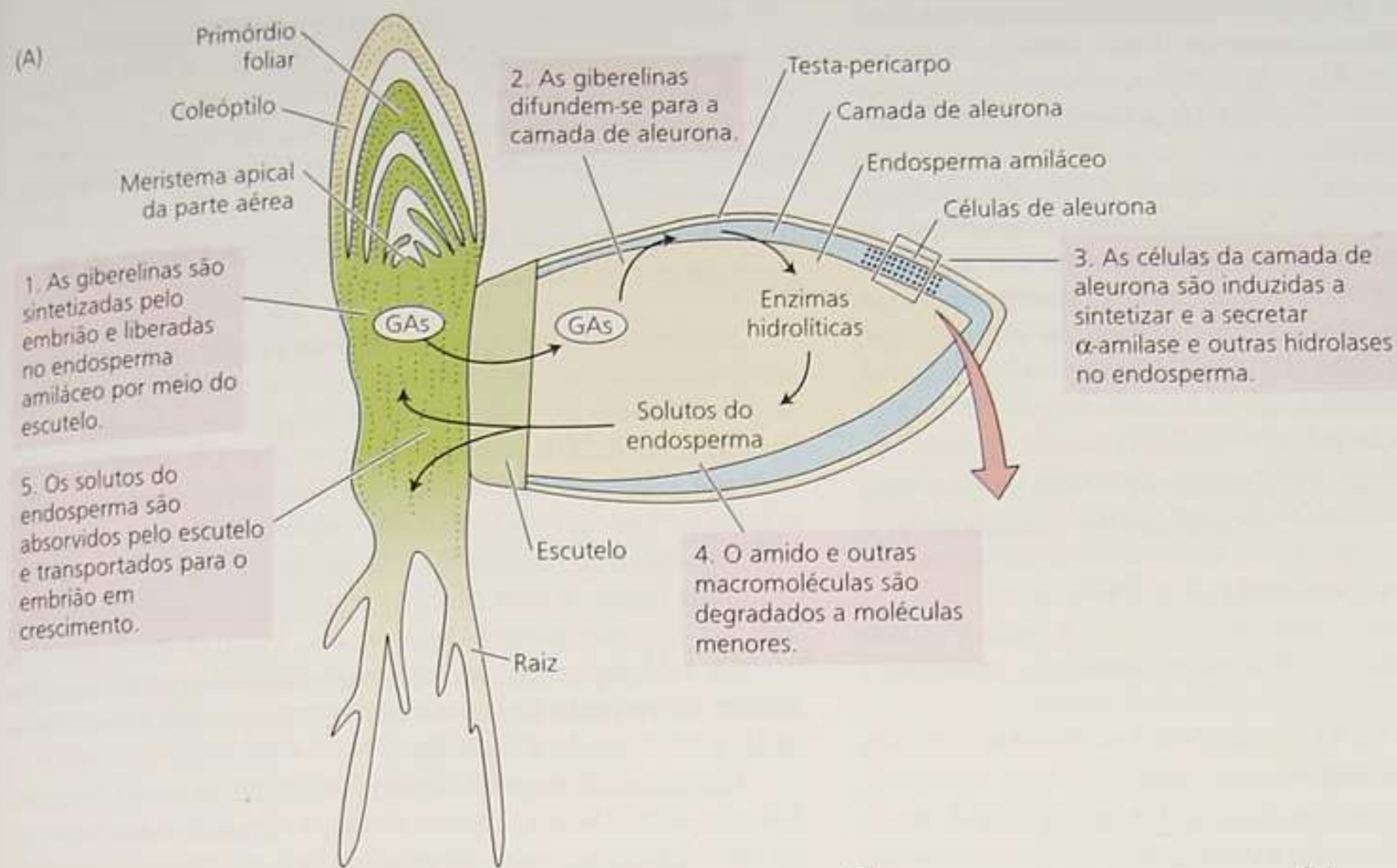



FIGURA 20.33 Estrutura de um grão de cevada e as funções de vários tecidos durante a germinação (A). Fotomicrografias da camada de aleurona de cevada (B) e protoplastos obtidos a partir da camada de aleurona de cevada nos estádios inicial (C) e tardio (D) de produção de amilase. As vesículas de armazenamento de proteínas (VAP) podem ser visualizadas em cada célula. G = fitina globóide; N= núcleo (fotografias de Bethke e cols., 1997, cedidas por P. Bethke).

3. Quais rotas de transdução de sinal que operam entre o receptor de giberelina e a produção da α-amilase?

O ácido giberélico acentua a transcrição do mRNA da α-amilase

Antes do desenvolvimento das abordagens de biologia molecular, já havia evidências fisiológicas e bioquímicas de que o ácido giberélico poderia promover a produção da α-amilase no nível da transcrição gênica (Jacobsen e cols., 1995). As duas principais linhas de evidências eram as seguintes:

1. A produção da α-amilase estimulada por GA_3 foi demonstrada ser bloqueada por inibidores da transcrição e tradução.
2. Estudos com isótopos pesados e isótopos radioativos demonstraram que o estímulo da atividade da α-amilase por giberelina envolvia principalmente a síntese *de novo* da enzima a partir dos aminoácidos em vez da ativação da enzima preexistente.

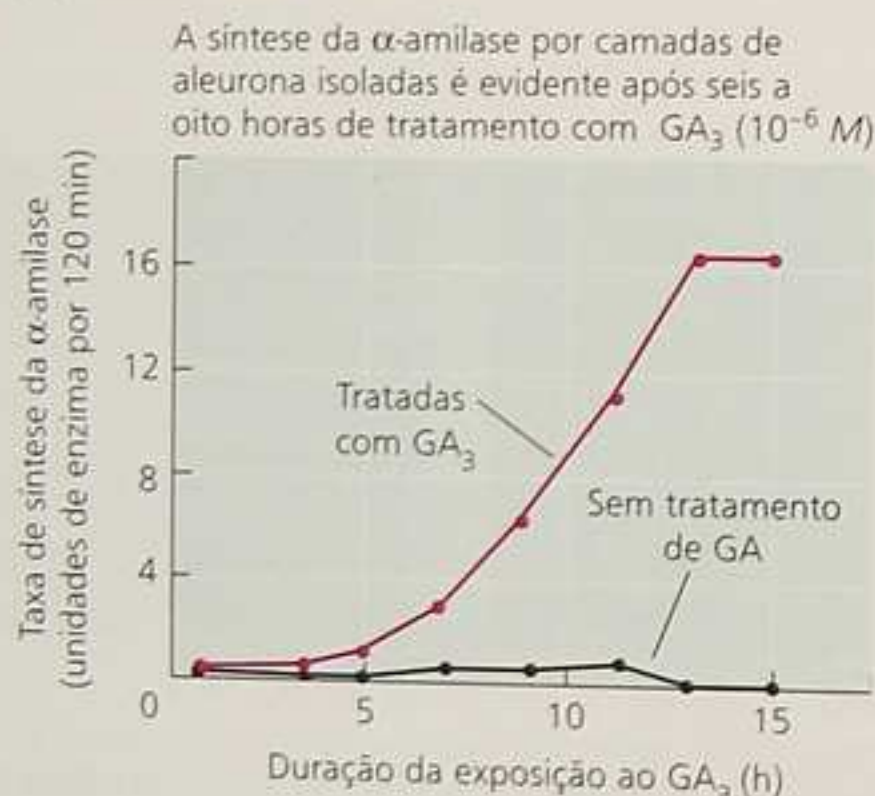
Atualmente, a evidência molecular definitiva mostra que a giberelina atua principalmente induzindo a expressão do gene da α-amilase. Tem sido demonstrado que o GA_3 aumenta o nível de mRNA a ser traduzido em α-amilase nas camadas de aleuro-

na (Figura 20.34). Além disso, utilizando núcleos isolados, os pesquisadores também demonstraram que havia preferencialmente uma transcrição aumentada do gene da α-amilase em vez de um decréscimo na degradação do mRNA (ver **Tópico 20.5 na Internet**).

A purificação do mRNA da α-amilase, produzido em grandes quantidades nas células de aleurona, permitiu o isolamento de clones genômicos contendo tanto o gene estrutural da α-amilase quanto as suas seqüências promotoras *upstream*. Essas seqüências promotoras foram fusionadas ao gene-repórter que codifica a enzima β-glucuronidase (GUS), a qual produz uma coloração azul em presença de um substrato artificial, quando o gene é expresso. A regulação da transcrição por giberelina foi provada quando tais genes quiméricos, contendo promotores α-amilase fusionados a genes-repórteres, foram introduzidos em protoplastos obtidos de células de aleurona e a produção da cor azul foi demonstrada ser estimulada por giberelina (Jacobsen e cols., 1995).

(A) **Síntese da enzima**

A síntese da α-amilase por camadas de aleurona isoladas é evidente após seis a oito horas de tratamento com GA_3 (10^{-6} *M*)

(B) **Síntese do mRNA**

Um aumento induzido por giberelina do mRNA da α-amilase a ser traduzido precede em várias horas a liberação desta enzima das células de aleurona.

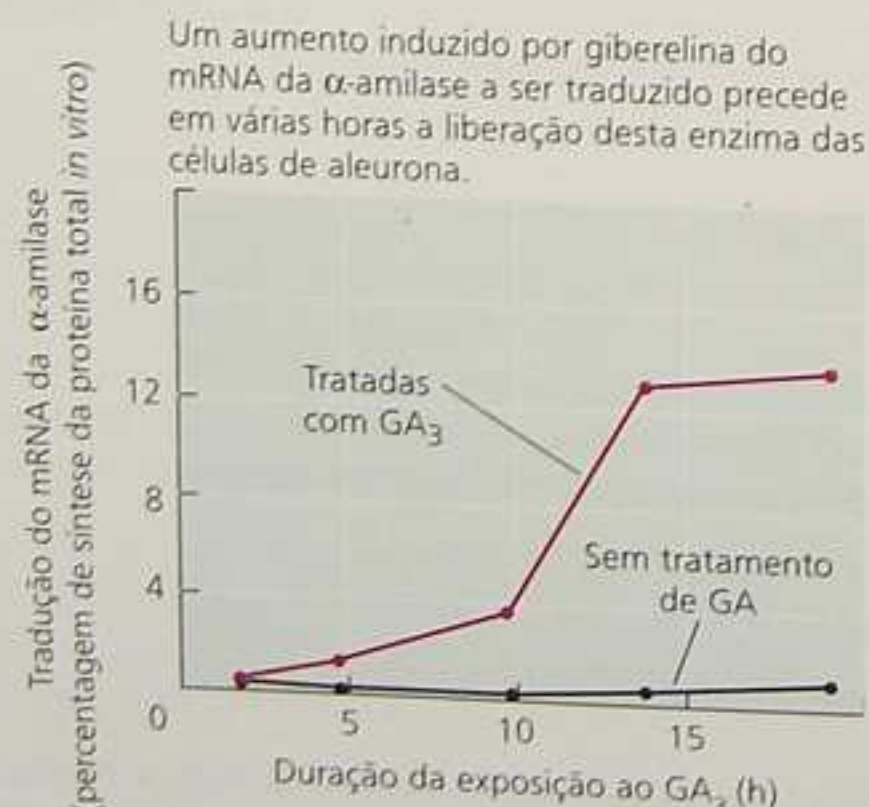



FIGURA 20.34 Efeitos da giberelina na síntese da enzima e do mRNA. Nesse caso, o mRNA da α-amilase foi medido pela produção *in vitro* dessa enzima como uma porcentagem de proteína total produzida (Higgins e cols., 1976).

A deleção parcial de seqüências de bases conhecidas dos promotores α-amilase de vários cereais indica que a seqüência que confere a capacidade de resposta à giberelina, os *elementos de resposta à giberelina*, estão localizadas a 200 ou 300 pares de bases *upstream* do sítio de início da transcrição (ver **Tópico 20.6 na Internet**).

Um fator de transcrição GA-MYB regula a expressão do gene da α-amilase

A estimulação da expressão do gene da α-amilase por giberelina é mediada por um fator de transcrição específico, que se liga ao promotor do gene da α-amilase (Lovegrove e Hooley, 2000). Para demonstrar tais proteínas de ligação ao DNA em arroz, foi utilizada a de *ensaio de retardo de mobilidade eletroforética* (do inglês, *mobility shift assay*) (ver **Tópico 20.7 na Internet**). Esse ensaio detecta um aumento de tamanho que ocorre quando o promotor da α-amilase liga-se a uma proteína isolada de células de aleurona tratadas com giberelina (Ou-Lee e cols., 1988). O ensaio também permite a identificação de seqüências de DNA reguladoras (**elementos de resposta à giberelina**) no promotor, que estão relacionadas com a ligação à proteína.

Elementos de resposta à giberelina idênticos foram encontrados nos promotores α-amilase de todos os cereais e sua presença foi demonstrada ser essencial para a indução da transcrição do gene da α-amilase por giberelina. Tais estudos demonstraram que a giberelina aumenta tanto o nível quanto a atividade do fator de transcrição protéico que desencadeia a produção do mRNA da α-amilase por se ligar a um elemento de regulação *upstream* no promotor do gene da α-amilase.

A seqüência do elemento de resposta à giberelina no promotor do gene da α-amilase mostrou-se similar àquelas dos sítios de ligação dos fatores de transcrição MYB, que regulam o crescimento e o desenvolvimento nas resposta ao fitocromo (ver **Capítulos 14 e 17 na Internet**) (Jacobsen e cols., 1995). Este conhecimento permitiu o isolamento do mRNA para um fator de transcrição MYB, denominado GA-MYB, associado à indução da expressão do gene da α-amilase por giberelina.

A síntese do mRNA do *GA-MYB* nas células de aleurona aumenta em três horas após a aplicação de giberelina, muitas horas após o aumento do mRNA da α-amilase (Gubler e cols., 1995) (Figura 20.35). O inibidor de tradução, cicloeximida, não tem efeito na produção do mRNA *MYB*, indicando que o *GA-MYB* é o *gene de resposta primária* ou *gene precoce*. Por outro lado, o gene da α-amilase é um *gene de resposta secundária* ou *tardio*, conforme indicado pelo fato de que sua transcrição é bloqueada pela cicloeximida.

Como a giberelina causa a expressão do gene *MYB*? Visto que a síntese protéica não está envolvida, a giberelina pode levar à ativação de um ou mais fatores de transcrição *preexistentes*. A ativação de fatores de transcrição é tipicamente mediada por eventos de fosforilação de proteínas que ocorrem ao final da via de transdução de sinal. Agora serão discutidos os conhecimentos sobre as rotas de sinalização envolvidas na produção da α-amilase induzida por giberelina, até o ponto da produção do GA-MYB.

Os receptores de giberelina podem interagir com as proteínas G na membrana plasmática

A localização do receptor de giberelina na superfície celular é sugerida a partir do fato que a mesma, ligada a microesferas incapazes de atravessar a membrana plasmática, continua ativa na in-

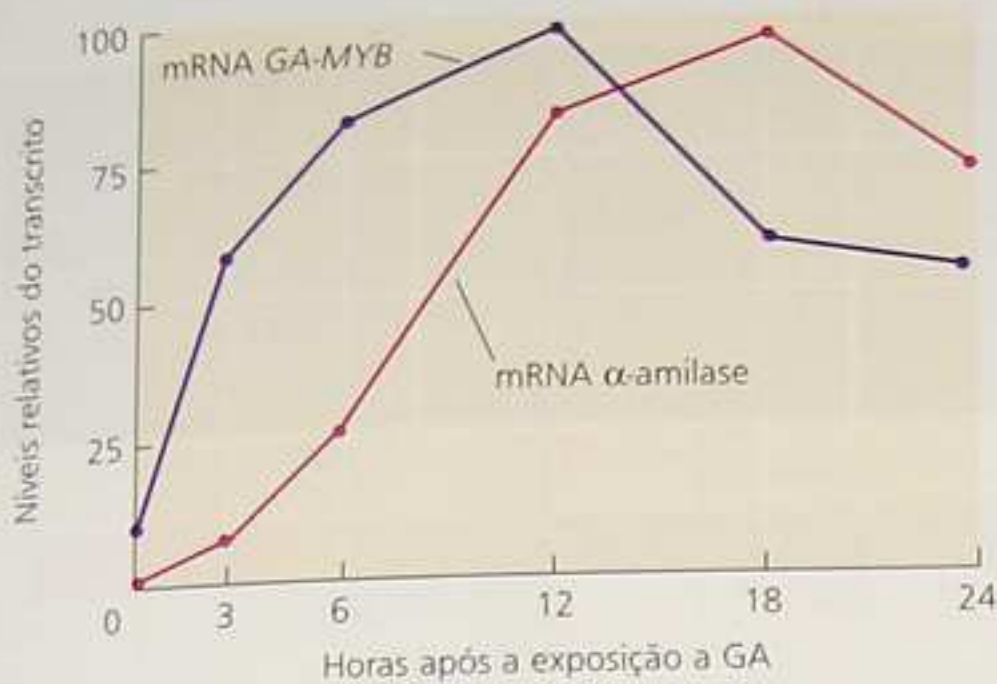



FIGURA 20.35 Curva de tempo de indução dos mRNA de *GA-MYB* e da α-amilase pelo ácido giberélico. A produção do mRNA *GA-MYB* precede a do mRNA da α-amilase em cerca de cinco horas. Esse resultado é consistente com o papel do *GA-MYB* como um gene inicial de resposta primária a GA que regula a transcrição do gene da α-amilase. Na ausência de GA, os níveis dos mRNA de *GA-MYB* e α-amilase são insignificantes (Gubler e cols., 1995).

dução da produção da α-amilase nos protoplastos de aleurona (Hooley e cols., 1991). Além disso, a microinjeção de GA_3 em protoplastos de células de aleurona não apresentou efeito, mas quando os protoplastos foram imersos em solução de GA_3, eles produziram α-amilase (Gilroy e Jones, 1994), resultados que sugerem que a giberelina atue na face externa da membrana plasmática.

Duas proteínas de ligação à giberelina da membrana plasmática foram isoladas pelo uso de membrana purificada e uma giberelina radioativamente marcada, que foi quimicamente modificada para se ligar de modo permanente à proteína a qual era tenuamente ligada. Visto que o excesso de giberelina reduz a ligação e que tais proteínas obtidas de uma planta de ervilha semi-anã e giberelina-insensível se ligam à giberelina de modo mais brando, elas podem representar receptores de giberelina (Lovegrove e cols., 1998).

Em células animais, as proteínas heterotriméricas de ligação ao GTP (proteínas G) na membrana celular estão freqüentemente relacionadas às primeiras etapas em uma rota entre um receptor de hormônio e os sinais citosólicos subseqüentes. Existem evidências de que as proteínas G estão também envolvidas nos eventos iniciais de sinalização de giberelina nas células de aleurona (Jones e cols., 1998).

O tratamento de protoplasto de aleurona de aveia com um peptídeo chamado Mas7, estimulador da conversão GTP/GDP pelas proteínas G, induziu a expressão do gene da α-amilase e estimulou a secreção dessa enzima, sugerindo que tal conversão na membrana celular constitui uma reação *en route* para a indução da biossíntese da α-amilase pela giberelina. Além disso, a expressão do gene da α-amilase e sua secreção induzidas pela giberelina foram inibidas por um análogo do nucleotídeo guanina que se liga à subunidade α das proteínas G heterotriméricas e inibe a conversão GTP/GDP, dando suporte adicional à conclusão anterior.

Recentes estudos genéticos têm fornecido evidências adicionais para o papel das proteínas-G como intermediárias na rota de transdução de sinal da giberelina. O mutante anão de arroz *dwarf 1* (*d1*) apresenta um gene defectivo que codifica a subunidade α. Além de ser anão, as camadas de aleurona do mutante *d1* sintetizam menos α-amilase em resposta à giberelina do que as camadas de aleurona do tipo não-mutante. Esta redução na produção da α-amilase pelo mutante *d1* demonstra que as proteínas G são um dos componentes da rota de transdução de sinal envolvida tanto na resposta de crescimento quanto na produção da α-amilase. No entanto, a diferença na produção da α-amilase entre o mutante e o tipo selvagem desaparece com o aumento da concentração de giberelina, sugerindo que a giberelina também pode estimular a produção da α-amilase por uma rota independente da proteína G (Ashikari e cols., 1999; Ueguchi-Tanaka e cols., 2000).

GMP cíclico, Ca^{+2} e proteínas quinases são possíveis intermediários de sinalização

Em células animais, as proteínas G podem ativar a enzima guanilil ciclase, a qual sintetiza GMPc a partir de GTP, levando ao aumento na concentração de GMPc. O GMP cíclico, por sua vez, pode regular canais de íons, níveis de Ca^{+2}, atividade de proteína quinase e transcrição (ver **Capítulo 14 na Internet**). Tem sido demonstrado que a giberelina provoca um aumento transitório nos níveis de GMPc na camada de aleurona em cevada, sugerindo um possível papel do GMPc na produção da α-amilase (Figura 20.36) (ver **Tópico 20.8 na Internet**) (Pensen e cols., 1996).

Em células animais, o cálcio e a calmodulina, uma proteína de ligação ao cálcio, agem como mensageiros secundários para muitas das respostas hormonais (ver **Capítulo 14 na Internet**) e têm sido relacionados a várias respostas dos vegetais aos estímulos ambientais e hormonais. Nos protoplastos de aleurona, o primeiro evento após a aplicação de giberelina é o aumento da concentração citoplasmática de cálcio, que ocorre muito antes do início da síntese da α-amilase (ver Figuras 20.36 e 20.37) (Bethke e cols., 1997). Sem o cálcio, a secreção da α-amilase não ocorre, embora nos protoplastos de aleurona de cevada continue normalmente. Assim, pode-se concluir que, em cevada, o cálcio não participa da rota de

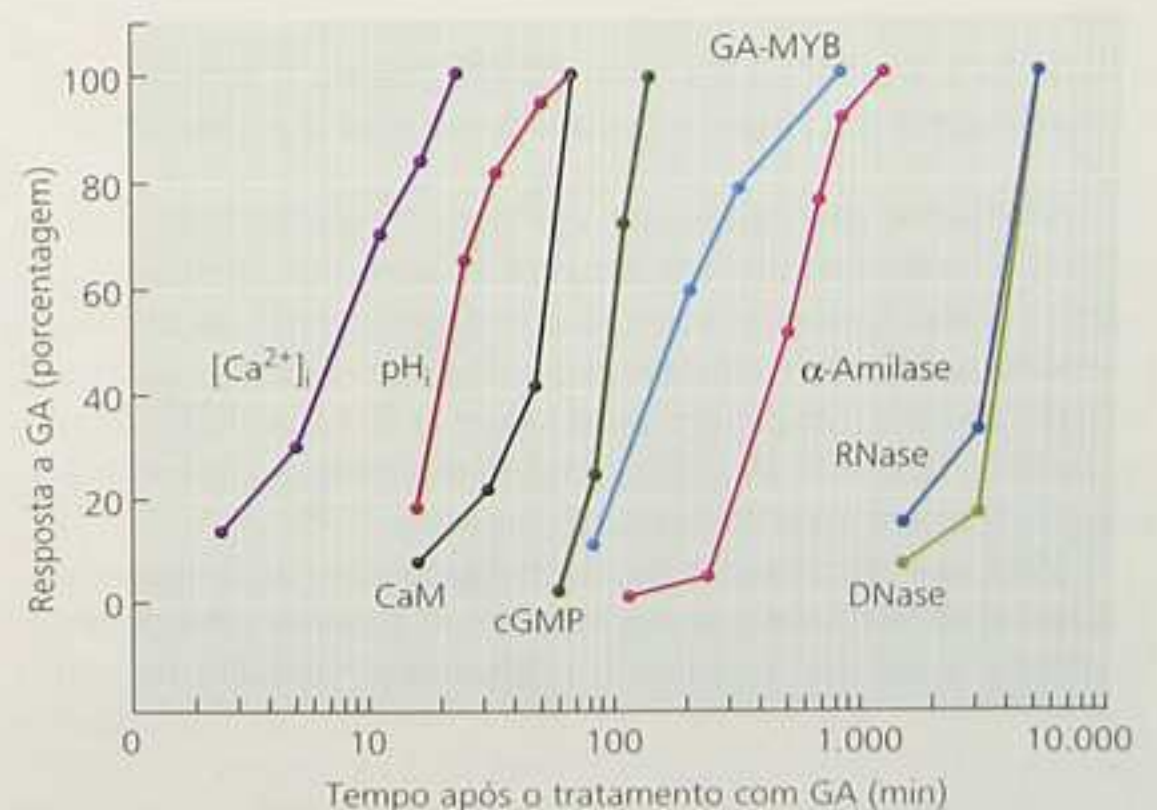
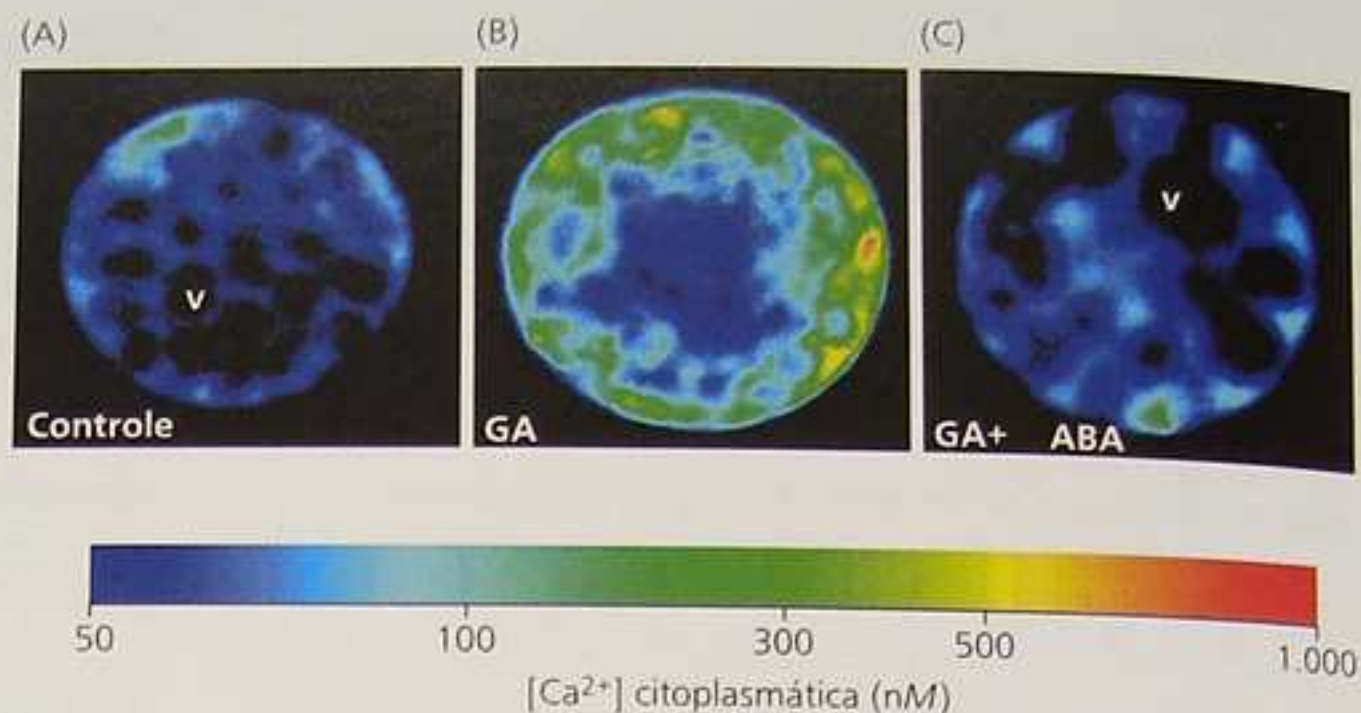



FIGURA 20.36 Uma rota múltipla de transdução de sinal é iniciada após a adição de GA a protoplastos de aleurona de cevada. O tempo de alguns destes eventos é mostrado (Bethke e cols., 1997).

FIGURA 20.37 O aumento no cálcio em protoplastos de aleurona de cevada após a adição de GA pode ser visualizado nesta imagem falsa cor. O nível de cálcio correspondendo às cores está identificado na escala inferior. (A) Protoplastos não-tratados. (B) Protoplastos tratados. (C) Protoplastos tratados com ácido abscísico (ABA) e GA. O ácido abscísico tem efeitos opostos aos da GA nas células de aleurona (Ritchie e Gilroy, 1998b).

sinalização para a transcrição do gene da α-amilase, embora desempenhe um papel na secreção da enzima.

A fosforilação de proteínas pela proteína quinase é um outro componente de muitas rotas de sinalização e parece que a giberelina não é exceção. A injeção de um substrato para proteína quinase em protoplastos de aleurona de cevada para competir com a fosforilação endógena de proteínas inibiu a secreção da α-amilase, indicando o envolvimento da fosforilação de proteínas na rota de secreção desta enzima (Ritchie e Gilroy, 1998a). Isso não afetou o aumento do cálcio estimulado por giberelina, sugerindo que a etapa da proteína quinase está *downstream* do evento de sinalização do cálcio.

Concluindo, a transdução de sinal da giberelina em células de aleurona parece envolver proteínas G e GMP cíclico, levando à produção do fator de transcrição GA-MYB, o qual induz a transcrição do gene da α-amilase. A secreção da α-amilase apresenta componentes iniciais semelhantes, mas também envolve um aumento no cálcio citoplasmático e fosforilação de proteínas. As rotas de sinalização detalhadas ainda devem ser elucidadas. Um modelo dos componentes bioquímicos conhecidos das rotas de transdução de sinal em células de aleurona está ilustrado na Figura 20.38.

A rota de transdução de sinal da giberelina é similar para o crescimento do caule e para a produção da α-amilase

Acredita-se que a giberelina age inicialmente por meio de uma rota ou de rotas comuns em todos os seus efeitos no desenvolvimento vegetal. Como foi visto, as abordagens genéticas utilizadas nos estudos do crescimento estimulado por giberelina levou à identificação de uma rota de regulação negativa *SPY/GAI/RGA*. As proteínas SPY, GAI e RGA agem como repressoras das respostas de giberelina e esta desativa esses repressores.

Visto que as camadas de aleurona do trigo anão giberelina-insensível são também insensíveis a GA, as mesmas rotas de transdução de sinal que regulam o crescimento parecem regular a produção da α-amilase induzida por giberelina. Na verdade, um gene tipo-*SPY* associado com a produção da α-amilase foi isolado de cevada (*HvSPY*) e a sua expressão é capaz de inibir a síntese da α-amilase induzida por giberelina, enquanto que fatores tipo-GA-MYB estão também envolvidos na cadeia de transdução de giberelina, regulando o crescimento do caule.

O arroz com a mutação *dwarf 1* também produz pouca α-amilase em resposta à giberelina. Como observado anteriormente, a mutação causadora do *dwarf 1* ocorre na subunidade α do complexo proteína G, fornecendo evidências de que a ação da giberelina tanto no alongamento do caule quanto na produção de α-amilase é regulada pelas proteínas G heterotriméricas da membrana plasmática.

Como as rotas de sinalização para o crescimento do caule e para a α-amilase estão determinadas, seria interessante comparar o quanto elas têm em comum e onde divergem.

RESUMO

As giberelinas constituem uma família de compostos definida por sua estrutura. Atualmente, chegam a mais de 125, algumas das quais encontradas somente no fungo *Giberella fujikuroi*. As giberelinas induzem um marcante alongamento de entrenós em alguns tipos de plantas, como em espécies anãs ou em roseta e gramíneas. Outros efeitos fisiológicos da giberelina incluem alterações na juvenilidade e na sexualidade da flor e na promoção do estabelecimento e crescimento do fruto e germinação de sementes. As giberelinas possuem várias aplicações comerciais, sobretudo no aumento do tamanho de uvas sem sementes e na maltagem da cevada.

As giberelinas são identificadas e quantificadas por cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massas, seguido pela separação por cromatografia líquida de alta eficiência. Os bioensaios podem ser utilizados para dar uma idéia inicial da presença de giberelina na amostra. Apenas certas giberelinas, em particular GA_1 e GA_4, são responsáveis pelos efeitos nas plantas; as demais são precursores ou metabólitos.

FIGURA 20.38 Modelo composto para a indução da síntese de α-amilase por giberelina em camadas de aleurona de cevada. Uma rota independente do cálcio induz a transcrição do gene da α-amilase; uma rota dependente do cálcio está envolvida na secreção da enzima (regulador negativo SPY foi omitido para simplificar o modelo). ▶

1. Inicialmente, o GA_1 liga-se ao um receptor da superfície celular.

2. O complexo do receptor de GA da superfície celular interage com a proteína G heterotrimérica, iniciando duas rotas separadas de transdução de sinal.

3. Uma rota cálcio-independente, envolvendo GMPc, resulta na ativação de um intermediário de sinalização.

4. O intermediário de sinalização ativado liga-se a proteínas repressoras DELLA no núcleo.

5. Os repressores DELLA são degradados quando ligados ao sinal GA.

6. A inativação dos repressores DELLA permite a expressão do gene *MYB*, bem como de outros genes, para dar continuidade à transcrição, ao processamento e à tradução.

7. A proteína MYB recém-sintetizada entra no núcleo e liga-se ao promotor do gene da α-amilase e de outras enzimas hidrolíticas.

8. A transcrição do gene da α-amilase e de outros genes de enzimas hidrolíticas é ativada.

9. A α-amilase e outras hidrolases são sintetizadas no RE rugoso.

10. As proteínas são secretadas pelo Golgi.

11. A via secretora requer o estímulo de GA pela rota de transdução de sinal dependente do cálcio-calmodulina.

GA_1
Receptor de GA
Proteína G heterotrimérica
Membrana plasmática
CÉLULA DA CAMADA DE ALEURONA
Rota de transdução de sinal Ca^{2+}-dependente, envolvendo calmodulina e proteína quinase
Rota de transdução de sinal Ca^{2+}-independente, com GMPc
Intermediário de sinalização de GA ativado
Secreção
NÚCLEO
Repressor DELLA
Repressor degradado
DNA
Gene *GA-MYB*
Transcrição e processamento
mRNA *GA-MYB*
Fator de transcrição GA-MYB
Gene da α-amilase
Transcrição e processamento
mRNA da α-amilase
Ribossomos
RE rugoso
Complexo de Golgi
Vesículas secretoras contendo α-amilase
α-amilase
Degradação do amido no endosperma

As giberelinas são compostos terpênicos, formados de unidades isoprênicas. O primeiro composto na rota de isoprenóides relacionado à biossíntese de giberelinas é o *ent*-caureno. A biossíntese a partir do *ent*-caureno ocorre nos plastídeos. O *ent*-caureno é convertido em GA_{12} — o precursor de todas as outras giberelinas — no envoltório do plastídeo e, então, no retículo endoplasmático através da monoxigenase citocromo P450. Normalmente, a hidroxilação no C-13 ocorre para originar GA_{53}.

GA_{53} ou GA_{12}, cada um com 20 átomos de carbono, são convertidos a outras giberelinas por oxidação seqüencial do carbono 20, seguido pela perda do mesmo para formar giberelinas de 19 carbonos. Tal processo é seguido pela hidroxilação do carbono 3, originando GA_1 ou GA_4, ativas no crescimento. Uma subseqüente hidroxilação no carbono 2 elimina a atividade biológica.

As etapas após GA_{53} ou GA_{12} ocorrem no citoplasma. Os genes para GA 20-oxidase (*GA20ox*), que catalisa as etapas entre GA_{53} e GA_{20}, para GA 3β-hidroxilase (ou GA 3-oxidase; *GA3ox*), que converte GA_{20} em GA_1 e GA 2-oxidase (*GA2ox*), que converte GA_1 em GA_8, têm sido isolados. Plantas anãs têm sido geneticamente modificadas pelo uso de *GA20ox* ou *GA3ox* anti-senso ou pela superexpressão de *GA2ox*. As giberelinas podem também ser glicosiladas, originando tanto uma forma inativada quanto uma forma de reserva.

Os níveis endógenos de giberelina ativa regulam sua própria síntese por ativar ou inibir a transcrição de genes para enzimas que participam da biossíntese ou degradação de giberelina. Fatores ambientais, como o fotoperíodo (i. é, causando crescimento do caule ou tuberização de batata), temperatura (vernalização) e a presença de auxina do ápice caulinar também regulam a biossíntese da giberelina pela transcrição de genes das enzimas da via biossintética. A luz regula a biossíntese de GA_1 por meio da regulação da transcrição do gene da degradação da giberelina e também causa um decréscimo na capacidade de resposta do alongamento do caule à presença de giberelina.

O efeito mais pronunciado da aplicação de giberelinas é o alongamento do caule em plantas anãs ou em roseta. As giberelinas estimulam o crescimento do caule por promover tanto o alongamento quanto a divisão celular. A atividade de algumas enzimas da parede tem sido relacionada ao crescimento induzido por giberelina e ao afrouxamento da parede celular. As divisões estimuladas por giberelina em arroz irrigado são reguladas na transição entre a replicação do DNA e a divisão celular.

Três tipos de mutantes de resposta à giberelina têm sido úteis na identificação de genes envolvidos na rota de sinalização da giberelina relacionada ao crescimento do caule: (1) mutantes anãos giberelina-insensíveis (p. ex., *gai-1*), (2) mutantes de reversão de deficiência de giberelina (p. ex., *rga*) e (3) mutantes de resposta constitutiva (mutantes *slender*) (p. ex., *spy*).

GAI e RGA estão relacionados com fatores de transcrição nuclear que reprimem o crescimento. Na presença de giberelina eles são degradados. O mutante *gai-1* e o gene mutante relacionado *rht*, do trigo anão, perderam a capacidade de responder à giberelina. O *SPY* codifica uma glicosil transferase, que é membro da cadeia de transdução de sinal anterior a GAI/RGA. Quando uma mutação interfere na função repressora de qualquer uma destas proteínas, as plantas tornam-se muito altas.

A giberelina induz a transcrição do gene da biossíntese da α-amilase nas células de aleurona dos grãos de cereais. Tal processo é mediado pela transcrição de um fator de transcrição específico, o GA-MYB, que se liga à região *upstream* do gene da α-amilase, ativando-o. O receptor da giberelina localiza-se na superfície das células de aleurona. As proteínas G e o GMPc têm sido relacionados como membros da cadeia de transdução de sinal na via para GA-MYB. O cálcio não está na rota da transcrição do gene da α-amilase, embora exerça um papel na secreção desta enzima por meio da fosforilação de proteínas.

A rota de transdução de sinal da giberelina é provavelmente similar tanto para o alongamento do caule quanto para a produção da α-amilase. Trigo e arroz anões apresentam baixa transcrição do gene da α-amilase. A giberelina atua por desativando repressores, tais como SPY, GAI e RGA *en route* para causar tanto o aumento do alongamento celular quanto a produção da α-amilase.

Material da Internet

Tópicos da Internet

20.1 Estrutura de algumas giberelinas importantes, seus precursores e derivados, além dos inibidores da biossíntese das giberelinas
São apresentadas as estruturas químicas de diversas giberelinas e dos inibidores da sua síntese.

20.2 Detecção de giberelina
A quantificação da giberelina é, agora, rotina graças aos modernos e sensíveis métodos físicos de detecção.

20.3 Alongamento do caule induzido por giberelina
São discutidos vários mecanismos de afrouxamento da parede celular induzido por giberelina.

20.4 CDKs e a divisão celular induzida por giberelina
São fornecidas informações adicionais sobre o mecanismo de regulação do ciclo celular por giberelina.

20.5 Síntese do mRNA da α-amilase induzida por giberelina
São fornecidas evidências sobre a indução da transcrição do mRNA da α-amilase por giberelina

20.6 Elementos promotores e resposta à giberelina
Os elementos de resposta à giberelina são mediadores dos efeitos da giberelina na transcrição da α-amilase.

20.7 Regulação da expressão do gene da α-amilase pelos fatores de transcrição
Descrição dos experimentos identificando os fatores de transcrição MYB como intermediários da transcrição gênica mediada por giberelina são descritos

20.8 Transdução de sinal de giberelina
Vários intermediários de sinalização têm sido relacionados à resposta à giberelina

Referências bibliográficas

Aach, H., Bode, H., Robinson, D.G., and Graebe, J. E. (1997) ent-Kaurene synthase is located in proplastids of meristematic shoot tissues. *Planta* 202: 211-219.

Ashikari, M., Wu, J., Yano, M., Sasaki, T., and Yoshimura, A. (1999) Rice gibberellin-insensitive dwarf mutant gene Dwarf 1 encodes the a-subunit of GTP-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10284-10289.

Behringer, F. J., Cosgrove, D. J., Reid, J. B., and Davies, P. J. (1990) Physical basis for altered stem elongation rates in internode length mutants of Pisum. *Plant Physiol.* 94:166-173.

Bethke, P. C., Schuurink, R., and Jones, R. L. (1997) Hormonal signalling in cereal aleurone. *J. Exp. Bot.* 48:1337-1356.

Campbell, N. A., Reece, J. B., and Mitchell, L. G. (1999) *Biology*, 5th ed. Benjamin Cummings, Menlo Park, CA.

Carrera, E., Bou, J., Garcia-Martinez, J. L., and Prat, S. (2000) Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J.* 22: 247-256.

Davies, P J. (1995) The plant hormones: Their nature, occurrence, and functions. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 1-12.

Dill, A., and Sun, T. P (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 159: 777-785.

Dill, A., Jung, H. S., and Sun, T. P (2001) The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:14162-14167.

Elliott, R. C., Ross, J. J., Smith, J. J., and Lester, D. R. (2001) Feed-forward regulation of gibberellin deactivation in pea. *J. Plant Growth Regul.* 20: 87-94.

Fabian, T., Lorbiecke, R., Umeda, M., and Sauter, M. (2000) The cell cycle genes cycA1;1 and cdc2Os-3 are coordinately regulated by gibberellin in planta. *Planta* 211: 376-383.

Gilroy S., and Jones, R. L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 1185-1192.

Gubler, F., Kalla, R., Roberts, J. K., and Jacobsen, J. V (1995) Gibberellin-regulated expression of a *myb* gene in barley aleurone cells: Evidence of myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7:1879-1891.

Hazebroek, J. P., and Metzger, J. D. (1990) Thermoinductive regulation of gibberellin metabolism in Thlaspi *arvense L.* I. Metabolism of [2H]-ent-Kaurenoic acid and [14C]gibberellin A1Z aldehyde. *Plant Physiol.* 94:157-165.

Hedden, P., and Kamiya, Y. (1997) Gibberellin biosynthesis: Enzymes, genes and their regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 431-460.

Hedden, P, and Phillips, A. L. (2000) Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5: 523-530.

Helliwell, C. A., Sullivan, J. A., Mould, R. M., Gray, J. C., Peacock, W. J., and Dennis, E. S. (2001) A plastid envelope location of *Arabidopsis* ent-kaurene oxidase links the plastid and endoplasmic reticulum steps of the gibberellin biosynthesis pathway. *Plant J.* 28:201-208.

Higgins, T. J. V, Zwar, J. A., and Jacobsen, J. V (1976) Gibberellic acid enhances the level of translatable mRNA for α-amylase in barley aleurone layers. *Nature* 260: 166-169.

Hooley, R., Beale, M. H., and Smith, S. J. (1991) Gibberellin perception at the plasma membrane of *Avena fatua* aleurone protoplasts. *Planta* 183: 274-280.

Ingram, T. J., Reid, J. B., and Macmillan, J. (1986) The quantitative relationship between gibberellin A1 and internode growth in *Pisum sativum* L. *Planta* 168: 414-420.

Ingram, T. J., Reid, J. B., Potts, W. C., and Murfet, I. C. (1983) Internode length in Pisum. IV The effect of the Le gene on gibberellin metabolism. *Physiol. Plant.* 59: 607-616.

Irish, E. E. (1996) Regulation of sex determination in maize. *Bioessays* 18:363-369.

Jacobsen, J. V, Gubler, F., and Chandler, P M. (1995) Gibberellin action in germinated cereal grains. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 246-271.

Jones, H. D., Smith, S. J., Desikan, R., Plakidou, D. S., Lovegrove, A., and Hooley R. (1998) Heterotrimeric G proteins are implicated in gibberellin induction of α-amylase gene expression in wild oat aleurone. *Plant Cell* 10: 24,5-253.

Kende, H., van-der, K. E., and Cho, H. T. (1998) Deepwater rice: A model plant to study stem elongation. *Plant Physiol.* 118: 1105-1110.

King, K. E., Moritz, T., and Harberd, N. P (2001) Gibberellins are not required for normal stem growth in *Arabidopsis thaliana* in the absence of GAI and RGA. *Genetics* 159: 767-776.

Kobayashi, M., Spray C. R., Phinney B. O., Gaskin, P, and MacMillan, J. (1996) Gibberellin metabolism in maize: The stepwise conversion of gibberellin Alfaldehyde to gibberellin AZO. *Plant Physiol.*110: 413-118.

Lester, D. R., Ross, J. J., Davies, P J., and Reid, J. B. (1997) Mendel's stem length gene (Le) encodes a gibberellin 3β-hydroxylase. *Plant Cell* 9:1435-1443.

Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., and Schwender, J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 101: 643-652.

Lovegrove, A., and Hooley, R. (2000) Gibberellin and abscisic acid signalling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5:102-110.

Lovegrove, A., Barratt, D. H. P, Beale, M. H., and Hooley, R. (1998) Gibberellin-photoaffinity labelling of two polypeptides in plant plasma membranes. *Plant J.* 15: 311-320.

O'Neill, D. P, Ross, J. J., and Reid, J. B. (2000) Changes in gibberellin A1 levels and response during de-etiolation of pea seedlings. *Plant Physiol.* 124: 805-812.

Ou-Lee, T. M., Turgeon, R., and Wu, R. (1988) Interaction of a gibberellin-induced factor with the upstream region of an α-amylase gene in rice aleurone tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6366-£369.

Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P, Flintham, J. E., Beales, J., Fish, L. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P, Snape, J. W., Gale, M. D., and Harberd, N. P (1999) 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature* 400: 256-261.

Pensen, S. P, Schuurink, R. C., Fath, A., Gubler, F., Jacobsen, J. V, and Jones, R. L. (1996) cGMP is required for gibberellic acid-induced gene expression in barley aleurone. *Plant Cell* 8: 2325-2333.

Phinney B. O. (1983) The history of gibberellins. In *The Biochemistry and Physiology of Gibberellins*, A. Crozier (ed.), Praeger, New York, pp. 15-52.

Reid, J. B., and Howell, S. H. (1995) Hormone mutants and plant development. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 448-485.

Ritchie, S., and Gilroy S. (1998a) Calcium-dependent protein phosphorylation may mediate the gibberellic acid response in barley aleurone. *Plant Physiol.* 116: 76,5-776.

Ritchie, S., and Gilroy S. (1998b) Tansley Review No. 100: Gibberellins: Regulating genes and germination. *New Phytol.* 140: 363-383.

Ross, J., and O'Neill, D. (2001) New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci.* 6: 2-I.

Ross, J. J., O'Neill, D. P, Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J., and Elliott, R. C. (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J.* 21: 547-552.

Ross, J. J., Reid, J. B., Gaskin, P and Macmillan, J. (1989) Internode length in *Pisum*. Estimation of GA, levels in genotypes *Le, le* and *led*. *Physiol. Plant.* 76:173-176.

Sachs, R. M. (1965) Stem elongation. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 16: 73-96.

Sauter, M., and Kende, H. (1992) Gibberellin-induced growth and regulation of the cell division cycle in deepwater rice. *Planta* 188: 362-368.

Schneider, G., and Schmidt, J. (1990) Conjugation of gibberellins in *Zea mays* L. In *Plant Growth Substances*, 1988, R. P Pharis and S. B. Rood eds., Springer, Heidelberg, Germany, pp. 300-306.

Silverstone, A. L., and Sun, T. P. (2000) Gibberellins and the green revolution. *Trends Plant Sci.* 5: 1-2.

Silverstone, A. L., Jung, H. S., Dill, A., Kawaide, H., Kamiya, Y, and Sun, T. P (2001) Repressing a repressor: Gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 13: 155,5-1565.

Sun, T. P. (2000) Gibberellin signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 374-380.

Thornton, T. M., Swain, S. M., and Olszewski, N. E. (1999) Gibberellin signal transduction presents... the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* 4: 424-128.

Capítulo

21 Citocininas: reguladores da divisão celular

AS CITOCININAS FORAM DESCOBERTAS durante as pesquisas dos fatores que estimulam as células vegetais a se dividirem (i. é, a sofrerem citocinese). Desde a sua descoberta, as citocininas têm apresentado muitos outros efeitos nos processos fisiológicos de desenvolvimento, incluindo a senescência foliar, a mobilização de nutrientes, a dominância apical, a formação e a atividade dos meristemas apicais, o desenvolvimento floral, a germinação de sementes e a quebra da dormência de gemas. As citocininas parecem também mediar muitos aspectos do desenvolvimento regulado pela luz, incluindo a diferenciação dos cloroplastos, o desenvolvimento do metabolismo autotrófico e a expansão de folhas e cotilédones.

Embora as citocininas regulem muitos processos celulares, o controle da divisão celular é o processo central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, sendo considerado indicador para essa classe de reguladores de crescimento. Por isso, será iniciada a discussão das funções das citocininas com uma breve consideração dos papéis da divisão celular no desenvolvimento normal, em tecidos lesionados, na formação da gália e na cultura de tecidos.

Mais adiante neste capítulo, será examinada a regulação da proliferação celular pelas citocininas. Posteriormente, serão abordadas as funções não diretamente relacionadas com a divisão celular: diferenciação dos cloroplastos, prevenção da senescência foliar e mobilização de nutrientes. Por fim, serão considerados os mecanismos moleculares básicos para a percepção e sinalização da citocinina.

DIVISÃO CELULAR E DESENVOLVIMENTO VEGETAL

As células vegetais formam-se a partir de divisões celulares em um meristema primário ou secundário. As células vegetais recém-formadas normalmente expandem-se e se diferenciam, mas, uma vez que assumam uma função — transporte, fotossíntese, sustentação, armazenamento ou proteção — em geral não se dividem novamente durante a sua vida. Nesse aspecto, parecem se assemelhar às células animais, que são consideradas terminalmente diferenciadas.

Contudo, a semelhança com o comportamento animal é apenas superficial. Quase todos os tipos de células vegetais que conservam o núcleo na maturidade apresentam a capacidade de se dividirem. Tal propriedade entra em

funcionamento durante certos processos, como a cicatrização de lesões e a abscisão foliar.

As células vegetais diferenciadas podem retomar a divisão

Sob certas circunstâncias, células maduras e diferenciadas de tecidos intactos podem retomar a divisão celular. Em muitas espécies, células maduras do córtex e/ou do floema retomam a divisão para formarem meristemas secundários, como o câmbio vascular ou o felogênio. A zona de abscisão na base do pecíolo da folha é a região onde as células maduras do parênquima podem se dividir novamente após um período de inativação mitótica, formando uma camada de células com paredes relativamente frágeis, onde pode ocorrer a abscisão (ver Capítulo 22).

A lesão de tecidos vegetais induz divisões celulares no local lesionado. Mesmo células altamente especializadas, como as fibras do floema e as células-guarda, podem ser, pelo menos uma vez, estimuladas pela lesão a se dividirem.

A atividade mitótica induzida por lesão é normalmente autolimitante; após poucas divisões as células derivadas param de se dividir e se rediferenciam. Entretanto, quando a bactéria de solo *Agrobacterium tumefaciens* invade uma lesão, ela pode causar neoplasia (formação de tumor), doença conhecida como galha da coroa. Esse fenômeno é uma evidência natural do potencial mitótico das células vegetais maduras.

Sem a infecção da *Agrobacterium*, a divisão celular induzida pela lesão cessaria em poucos dias e algumas das novas células se diferenciariam em um tecido vascular ou em uma camada protetora do felema. No entanto, a *Agrobacterium* altera as características das células que se dividem em resposta à lesão, tornando-as semelhantes a um tumor. Elas não param de se dividir, ao contrário, elas continuam sua divisão ao longo da vida do vegetal, produzindo uma massa desorganizada semelhante a um tecido tumoral denominada **galha** (Figura 21.1). Esta importante doença será discutida mais tarde neste capítulo.

FIGURA 21.1 Formação de tumor no caule de um tomateiro infectado com a bactéria da galha da coroa, *Agrobacterium tumefaciens*. Dois meses antes da fotografia ser obtida, o caule foi lesionado e inoculado com uma cepa virulenta da bactéria da galha da coroa (Aloni e cols., 1998, cedida por R. Aloni).

Fatores difusíveis podem controlar a divisão celular

As considerações tratadas na seção anterior sugerem que as células vegetais maduras param de se dividir em decorrência do não-recebimento de um determinado sinal, possivelmente um hormônio, o qual é necessário para o início da divisão celular. A idéia de que a divisão celular pode ser iniciada por um fator difusível foi proposta pelo fisiologista vegetal austríaco G. Haberlandt, que, por volta de 1913, demonstrou que o tecido vascular possui uma substância, ou substâncias, solúvel em água, que estimula a divisão celular em tecidos lesionados de tubérculo de batata. O esforço para a determinação da natureza desse fator (ou fatores) levou à descoberta das citocininas em 1950.

Os tecidos e os órgãos vegetais podem ser cultivados

A possibilidade de crescerem células, tecidos e órgãos em um simples meio de cultura com nutrientes, semelhante à cultura de microrganismos em tubos ou placas de petri, vem, há muito despertando o interesse de biólogos. Na década de 1930, Philip White demonstrou que raízes de tomateiro poderiam crescer indefinidamente em um simples meio nutritivo, contendo apenas sacarose, sais minerais e algumas poucas vitaminas, sem a adição de hormônios (White, 1934).

Ao contrário das raízes, os tecidos caulinares isolados exibem muito pouco crescimento em meio de cultura sem a adição de hormônios. Mesmo se a auxina for adicionada, ocorre somente um crescimento limitado, que em geral não se mantém. Com freqüência, esse crescimento induzido pela auxina deve-se apenas ao alongamento celular. As partes aéreas da maioria dos vegetais não podem crescer em um meio simples sem hormônios, mesmo quando se cultivam tecidos caulinares contendo os meristemas apical ou lateral, até que se formem raízes adventícias. Uma vez que o tecido caulinar tenha enraizado, o crescimento da parte aérea é retomado, mas agora como uma planta completa.

Tais observações indicam que existe uma diferença na regulação da divisão celular nos meristemas da raiz e da parte aérea. Sugerem também que algum(ns) fator(es) derivado(s) da raiz pode(m) regular o crescimento na parte aérea.

A galha da coroa, formada nos tecidos do caule, constitui-se uma exceção. Após a formação da galha, o aquecimento da planta a 42 °C irá matar a bactéria que induziu a sua formação. A planta irá sobreviver ao tratamento térmico e o tecido da galha continuará crescendo como um tumor livre de bactérias (Braun, 1958).

Os tecidos removidos desse tumor sem bactérias são capazes de crescer em um meio de cultura simples e quimicamente definido, o qual não sustentaria a proliferação de tecidos normais retirados de caules de plantas da mesma espécie. Entretanto, tais tecidos removidos do tumor não são organizados. Ao contrário, eles crescem como uma massa desorganizada e relativamente indiferenciada de células denominada **calo**.

Algumas vezes, o calo é formado naturalmente em resposta a uma lesão ou, em enxertia, no local de união de caules de duas plantas diferentes. Os tumores da galha da coroa constituem um tipo específico de calos, que crescem tanto em cultura quanto ligados à planta. A descoberta de que os tecidos da galha podem ser

cultivados demonstra que as células provenientes dos tecidos de caule são capazes de se proliferarem em cultura e que o contato das células do caule com a bactéria pode estimular as células do caule a produzirem fatores que promovam a divisão.

DESCOBERTA, IDENTIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DAS CITOCININAS

Um grande número de substâncias foi testado na tentativa de iniciar e de manter a proliferação de tecidos caulinares em cultura. Vários tipos de materiais, desde extrato de levedura até suco de tomate, apresentaram efeitos positivos, pelo menos em alguns tecidos. Entretanto, o crescimento da cultura foi estimulado de forma mais intensa quando se utilizou no meio de cultura o endosperma líquido de coco, também conhecido como água de coco.

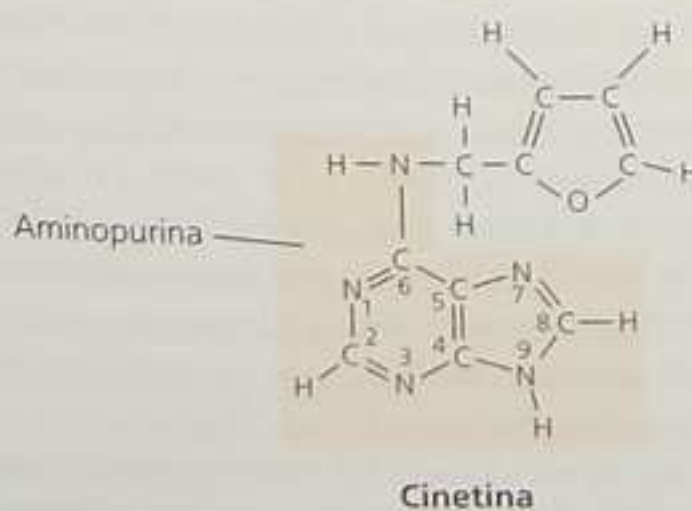
O meio nutritivo de Philip White, suplementado com uma auxina e com 10 a 20% de água de coco, é capaz de manter uma contínua divisão das células maduras e diferenciadas de uma ampla variedade de tecidos e espécies vegetais, levando à formação de calos (Caplin e Steward, 1948). Tal descoberta indicou que a água de coco possui uma substância, ou substâncias, que estimula as células maduras a iniciarem e se manterem em um ciclo de divisões celulares.

Posteriormente, foi identificado que a água de coco possuía a citocinina *zeatina*. Contudo, esta descoberta só foi feita vários anos após a das citocininas (Letham, 1974). A primeira citocinina a ser descoberta foi a cinetina, um análogo sintético.

A cinetina foi descoberta como um produto da quebra do DNA

Nas décadas de 1940 e 1950, Folke Skooge e colaboradores, da Universidade de Winsconsin (EUA) testaram inúmeras substâncias com capacidade para iniciar e manter a proliferação de células de medula de fumo em cultura. Eles observaram que a base adenina do ácido nucléico possuía um pequeno efeito promotor; então, testaram a possibilidade de que ácidos nucléicos estimulariam a divisão celular nesses tecidos. Inesperadamente, foi observado que o DNA autoclavado do esperma de arenque apresentava um forte efeito na promoção da divisão celular.

Após muito trabalho, foi identificado no DNA autoclavado uma pequena molécula denominada **cinetina**, que foi demonstrada ser um derivado da adenina (ou aminopurina), 6-furfurilaminopurina (Miller e cols., 1955):

Aminopurina

Cinetina

Na presença da auxina, a cinetina estimularia a proliferação do tecido parenquimático da medula do tabaco em cultura. Sem a auxina no meio de cultura, a cinetina não promove nenhuma divisão celular (para mais detalhes, ver **Tópico 21.1 na Internet**).

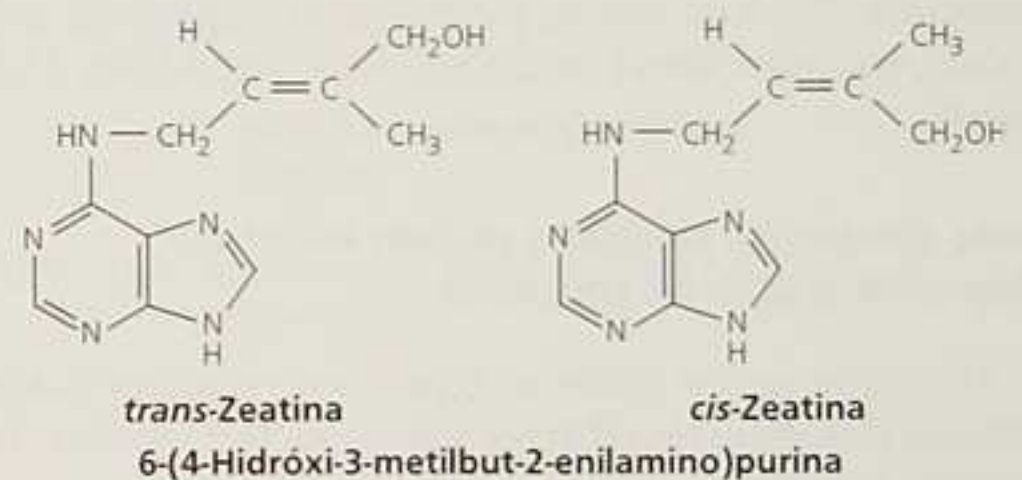
A cinetina não é um regulador de crescimento que ocorra naturalmente nos vegetais e também não ocorre como uma base no DNA de nenhuma espécie. Ela é o produto da degradação induzida pelo aquecimento do DNA, no qual o açúcar desoxirribose da adenosina é convertido a um anel furfuril e deslocado da posição 9 para a 6 no anel da adenina.

A descoberta da cinetina foi importante para demonstrar que a divisão celular pode ser induzida por uma simples substância química. A descoberta da cinetina sugeriu a ocorrência natural de moléculas com estruturas similares à cinetina que regulam a atividade de divisão celular nos vegetais. A hipótese foi comprovada.

A zeatina é a citocinina com maior ocorrência natural

Vários anos após a descoberta da cinetina, foi encontrada em extratos de endosperma imaturo de milho (*Zea mays*) uma substância com o mesmo efeito biológico da cinetina. Essa substância estimula a divisão de células vegetais maduras, quando adicionada ao meio de cultura juntamente com uma auxina. Letham (1973) isolou a molécula responsável por essa atividade e identificou-a como *trans*-6-(4-hidróxi-3-metilbut-2-enilamino)purina, a qual chamou de **zeatina:**

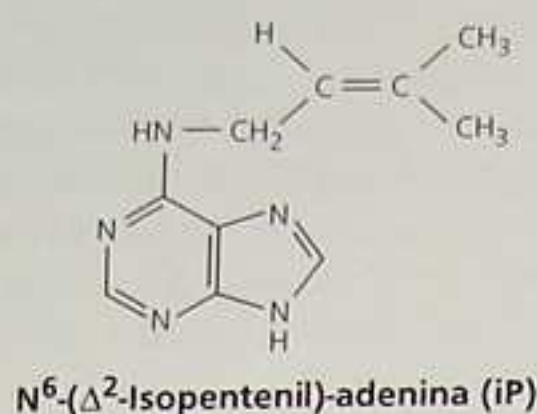
trans-Zeatina *cis*-Zeatina

6-(4-Hidróxi-3-metilbut-2-enilamino)purina

A estrutura molecular da zeatina é similar à da cinetina. As duas moléculas são derivadas da adenina ou da aminopurina. Embora elas apresentem cadeias laterais diferentes, em ambos os casos a cadeia lateral é ligada ao nitrogênio 6 da aminopurina. Uma vez que a cadeia lateral da zeatina possui uma ligação dupla, ela pode ocorrer na configuração *cis* ou *trans*.

Nos vegetais superiores, a zeatina ocorre em ambas as configurações *cis* e *trans*, formas essas que podem ser interconvertidas por uma enzima chamada de *zeatina isomerase*. Embora a forma *trans* da zeatina seja muito mais ativa nos testes biológicos, a *cis* também pode desempenhar um importante papel, como é sugerido pelo fato de haver sido encontrada em altos níveis em numerosas plantas e tecidos específicos. O gene que codifica a enzima glicosil transferase, específica para a *cis*-zeatina, foi recentemente clonado, auxiliando na defesa do papel biológico dessa isoforma de zeatina.

Desde a sua descoberta em endospermas imaturos de milho, a zeatina tem sido encontrada em muitas plantas e em algumas bactérias. Ela é a citocinina predominante nos vegetais superiores, mas outros representantes da aminopurina com atividade de citocinina têm sido isolados de muitas espécies de vegetais e de bactérias. Tais aminopurinas diferem da zeatina pela natureza da cadeia lateral ligada ao nitrogênio 6 ou na ligação de uma cadeia lateral ao carbono 2:

N^6-(Δ^2-Isopentenil)-adenina (iP)

Diidrozeatina (DZ)

Além disso, tais citocininas podem estar presentes nas plantas como um **ribosídeo** (no qual a ribose está ligada ao nitrogênio 9 do anel da purina), um **ribotídeo** (no qual a ribose possui um grupo fosfato) ou um **glicosídeo** (no qual a ribose está ligada ao nitrogênio 3, 7 ou 9 do anel da purina, ou ao oxigênio da zeatina ou, ainda, na cadeia lateral da diidrozeatina) (ver Tópico 21.2 na Internet).

Alguns compostos sintéticos podem imitar ou antagonizar a ação da citocinina

As citocininas são definidas como compostos que possuem atividades biológicas semelhantes àquelas da *trans*-zeatina. Essas atividades incluem:

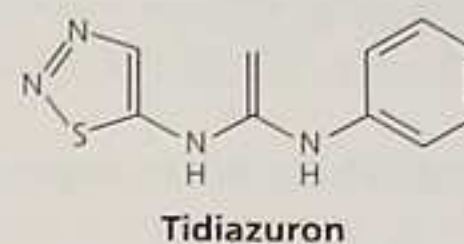
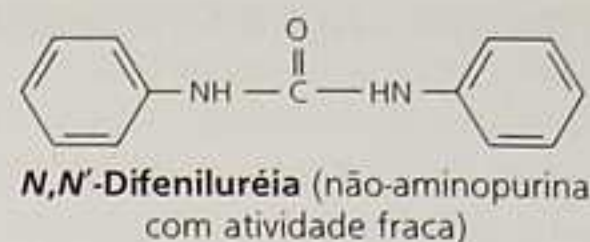
- Induzir a divisão celular em calos na presença da auxina.
- Promover a formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, quando em concentrações molares adequadas de auxina.
- Retardar a senescência foliar.
- Promover a expansão dos cotilédones de dicotiledôneas.

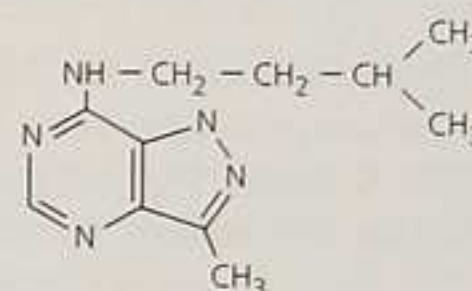
Muitos compostos químicos com atividade de citocinina têm sido sintetizados e testados. As análises desses compostos possibilitam determinar a necessidade estrutural para a atividade. Aproximadamente todos os compostos com atividade de citocinina possuem uma substituição no N^6 da aminopurina, como a benziladenina (BA):

Benziladenina (benzilaminopurina) (BA)

e todas as citocininas que ocorrem naturalmente são derivadas da aminopurina. Há também compostos sintéticos de citocininas que não foram encontrados nas plantas; o mais notável deles é a citocinina tipo difeniluréia, tidiazuron, utilizado comercialmente como desfoliante e herbicida:

***N,N'*-Difeniluréia** (não-aminopurina com atividade fraca)

Tidiazuron

No processo de determinação das necessidades estruturais para a atividade das citocininas, os pesquisadores encontraram algumas moléculas que agem como *antagonistas das citocininas*:

3-Metil-7-(3-metilbutilamino)pirazolo[4,3-D]pirimidina

Tais moléculas são capazes de bloquear a ação das citocininas, podendo seus efeitos ser superados pela adição de citocinina. As moléculas de ocorrência natural com atividade de citocinina podem ser detectadas e identificadas, utilizando-se uma combinação de bioensaios e métodos físicos (ver Tópico 21.3 na Internet).

As citocininas podem ocorrer tanto na forma livre quanto na forma ligada

As citocininas estão presentes como moléculas livres (não-ligadas covalentemente a qualquer macromolécula) nas plantas e em certas bactérias. As citocininas livres têm sido encontradas em uma grande variedade de angiospermas e, provavelmente, sejam universais nesse grupo de plantas. Elas foram também encontradas em algas, diatomáceas, musgos, pteridófitas e coníferas.

A função de regulação das citocininas tem sido demonstrada somente em angiospermas, coníferas e musgos, mas tais hormônios podem agir regulando o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de todos os vegetais. Em geral, a zeatina é a citocinina livre de ocorrência natural mais abundante, porém a *diidrozeatina (DZ)* e a *isopentenil adenina (iP)* igualmente são encontradas nos vegetais superiores e nas bactérias. Numerosos derivados dessas três citocininas têm sido identificados em extratos vegetais (ver a ilustração destas estruturas na Figura 21.6).

O RNA transportador (tRNA) não possui apenas os quatro nucleotídeos utilizados para construir todas as outras formas do RNA, mas também alguns nucleotídeos pouco comuns, cuja base foi modificada. Algumas dessas bases "hipermodificadas" agem

como citocininas, quando o RNA transportador é hidrolisado e testado em alguns bioensaios para tais hormônios. Alguns RNAs transportadores vegetais possuem *cis*-zeatina como uma base hipermodificada. Entretanto, as citocininas não estão restritas aos tRNA dos vegetais. Elas fazem parte de certos RNAs transportadores presentes em todos os organismos, desde bactérias até humanos (para detalhes, ver **Tópico 21.4 na Internet**).

A citocinina com atividade hormonal é uma base livre

É difícil de determinar quais tipos de citocininas representam a forma ativa do hormônio, mas a recente identificação do receptor CRE1 tem permitido examinar a questão. Importantes experimentos têm demonstrado que a forma de base livre da *trans*-zeatina, mas não o seu derivado ribosídeo ou ribotídeo, liga-se diretamente ao CRE1, indicando que a base livre é a forma ativa (Yamada e cols., 2001).

Embora a forma de base livre da *trans*zeatina seja considerada como o hormônio ativo, alguns outros compostos possuem atividade de citocinina, por serem rapidamente convertidos a zeatina, diidrozeatina ou isopentenil adenina ou por liberarem tais compostos de outras moléculas, como a citocinina glicosídeo. Por exemplo, as culturas de células de tabaco não crescem, a menos que a citocinina ribosídeo adicionada ao meio de cultura seja convertida à forma base livre.

Em outro exemplo, os cotilédones excisados de rabanete crescem quando são cultivados em uma solução contendo a base benziladenina (BA, uma citocinina aminopurina com o N^6 substituído). Os cotilédones cultivados absorvem rapidamente o hormônio e o convertem em vários BA glicosídeos, BA ribonucleosídeo e BA ribonucleotídeo. Quando os cotilédones são transferidos de volta para o meio sem citocinina, tanto a taxa de crescimento quanto as concentrações do BA, BA ribonucleosídeo e BA ribonucleotídeo dos tecidos diminuem. Entretanto, o nível do BA glicosídeo permanece constante. Essa descoberta sugere que os glicosídeos não podem ser a forma ativa do hormônio.

Algumas bactérias fitopatogênicas, insetos e nematódeos secretam citocininas livres

Algumas bactérias e fungos estão intimamente associadas às plantas superiores. Muitos desses microrganismos produzem e secretam quantidades substanciais de citocininas e/ou induzem as células vegetais a sintetizarem hormônios vegetais, incluindo as citocininas (Akiyoshi e cols., 1987). As citocininas produzidas por microrganismos incluem a *trans*-zeatina, [9R]iP, *cis*-zeatina e seus ribosídeos (Figura 21.2). A infecção de tecidos vegetais com esses microrganismos pode induzir o tecido a se dividir e, em alguns casos, a formar estruturas especiais, como as micorrizas, onde o microrganismo pode co-existir em uma relação mutualista com a planta.

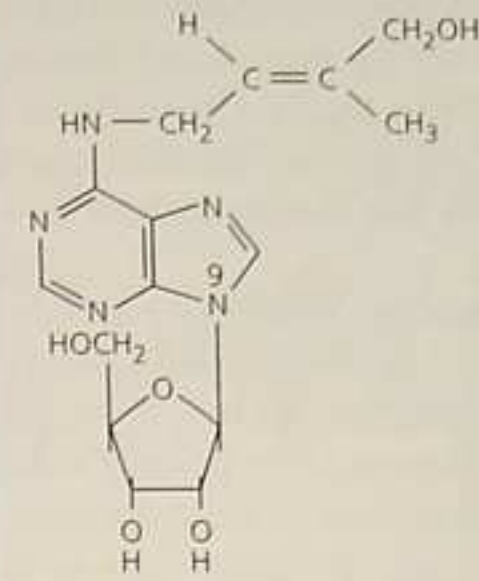
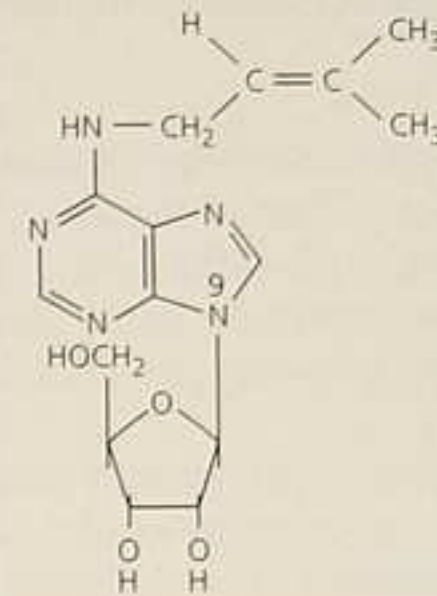
Além da bactéria da galha da coroa, *Agrobacterium tumefaciens*, outras bactérias patogênicas podem estimular as células a se dividir. Por exemplo, *Corynebacterium fascians* é a maior causa do crescimento anormal conhecido como **vassoura-de-bruxa** (Figura 21.3). As partes aéreas das plantas infectadas pela *C. fascians* assemelham-se à palha velha de uma vassoura, devido às gemas laterais, que normalmente permanecem dormentes, serem estimuladas a crescer pela citocinina produzida pela bactéria (Hamilton e Lowe, 1972).

Ribosil-zeatina (zeatina ribosídica)

N^6-(Δ^2-Isopentenil)adenosina ([9R]iP)

FIGURA 21.2 Estruturas da ribosil-zeatina e N^6 –(Δ2-isopentenil)adenosina ([9R]iP).

FIGURA 21.3 Vassoura-de-bruxa em *Abies balsamea* (foto © Gregory K. Scott / Photo Researchers, Inc.).

A infecção por organismos aparentados com a galha da coroa, *Agrobacterium rhizogenes*, provocam a formação de massas nas raízes, em vez de calos no local da infecção. *A. rhizogenes* é capaz de modificar o metabolismo da citocinina nos tecidos infectados da planta segundo um mecanismo que será descrito mais tarde neste capítulo.

Certos insetos secretam citocininas, as quais podem exercer um papel na formação da galha utilizada como um local para alimentação desses animais. Nematódeos de nódulos de raízes também produzem citocininas, que podem estar envolvidas na manipulação do desenvolvimento do hospedeiro para produzir as células gigantes, das quais os nematódeos se alimentam (Elzen, 1983).

BIOSSÍNTESE, METABOLISMO E TRANSPORTE DAS CITOCININAS

As cadeias laterais das moléculas naturais de citocininas são quimicamente relacionadas com a borracha, com pigmentos carotenóides, com os hormônios giberelina e ácido abscísico e com compostos de defesa vegetal conhecidos como fitoalexinas. Todos são constituídos, pelo menos em parte, por unidades de isopreno (ver Capítulo 13).

O isopreno é semelhante em estrutura à cadeia lateral da zeatina e do iP (ver as estruturas representadas na Figura 21.6). Tais cadeias laterais das citocininas são sintetizadas a partir de um derivado do isopreno. As grandes moléculas da borracha e dos carotenóides são constituídas pela polimerização de muitas unidades de isopreno; as citocininas têm somente uma dessas unidades. O(s) precursor(es) para a formação destas estruturas de isopreno é o ácido mevalônico ou o piruvato, acrescido de 3-fosfoglicerato, dependendo da rota que esteja envolvida (ver Capítulo 13). Esses precursores são convertidos às unidades biológicas de isopreno, o dimetilalil difosfato (DMAPP).

As células da galha da coroa recebem um gene para a síntese de citocinina

Os tecidos do tumor da galha da coroa sem a bactéria proliferam no meio de cultura livre de hormônios. Os tecidos da galha da coroa contêm níveis substanciais de auxina e de citocininas livres. Além disso, o uso de adenina radiotivamente marcada nos tecidos da galha da coroa de *Vinca rosea* demonstrou que essa molécula foi incorporada tanto na zeatina quanto na zeatina ribosídeo, indicando que os tecidos da galha possuem a via de biossíntese de citocinina. Os tecidos do caule não-transformados pela *Agrobacterium* deixam de incorporar a adenina marcada nas citocininas.

Durante a infecção pela *Agrobacterium tumefaciens*, as células do vegetal incorporam o DNA da bactéria em seus cromossomos. As cepas virulentas de *Agrobacterium* possuem um grande plasmídeo, conhecido como **plasmídeo Ti.** Plasmídeos são fragmentos circulares de DNA extracromossômico, que não são essenciais para a vida da bactéria. Contudo, freqüentemente os plasmídeos têm genes que aumentam a capacidade das bactérias de sobreviver em ambientes específicos.

Uma pequena porção do plasmídeo Ti, conhecido como **T-DNA,** é incorporado no DNA nuclear da célula do vegetal hospedeiro (Figura 21.4) (Chilton e cols., 1977). O T-DNA transporta genes necessários à biossíntese da *trans*-zeatina e da auxina, bem como de um membro da classe rara de compostos contendo nitrogênio, as *opinas* (Figura 21.5). Essas não são sintetizadas pelas plantas, exceto se houver transformação pela bactéria.

O gene do T-DNA envolvido na biossíntese da citocinina — conhecido como gene *ipt*[1] — codifica a enzima **isopentenil transferase (IPT),** que transfere o grupo isopentenil do DMAPP para o AMP (monofosfato de adenosina) para formar a isopentenil adenina ribotídeo (Figura 21.6) (Akiyoshi e cols., 1984; Barry e cols., 1984). O gene *ipt* tem sido chamado de locus *tmr*, pois, quando *inativado* por mutação, resulta em tumores formados por muitas raízes. A isopentenil adenina ribotídeo pode ser convertida nas citocininas ativas isopentenil adenina, *trans*zeatina e diidrozeatina por enzimas endógenas das células vegetais. Esta via de conversão é semelhante à rota de síntese das citocininas que tem sido proposta para tecidos normais (ver Figura 21.6).

O T-DNA também possui dois genes que codificam enzimas que convertem o triptofano na auxina ácido indol-3-acético (AIA). Esta rota de biossíntese da auxina difere da via das células não transformadas, envolvendo a indolacetamida como um intermediário (ver Figura 19.6). O gene *ipt* e os dois genes para a biossíntese da auxina do T-DNA são **fitoncogenes,** visto que eles podem induzir tumores nas plantas (ver **Tópico 21.5 na Internet**).

Como os seus promotores também são promotores eucarióticos de plantas, nenhum dos genes do T-DNA é expresso na bactéria; eles são transcritos preferencialmente após sua inserção no cromossomo vegetal. A transcrição dos genes leva à síntese das enzimas que eles codificam, resultando na produção da zeatina, da auxina e de uma opina. A bactéria pode utilizar a opina como fonte de nitrogênio, mas as células das plantas superiores não. Assim, devido à transformação das células vegetais, a bactéria proporciona a si mesma um ambiente para se desenvolver (o tecido da galha), onde as células hospedeiras são direcionadas para produzir uma substância (opina) que somente a bactéria utiliza para a sua nutrição (Bomhoff e cols., 1976).

Uma importante diferença entre o controle da biossíntese da citocinina nos tecidos da galha da coroa e nos tecidos normais é que os genes do T-DNA para a síntese de citocinina são expressos em todas as células infectadas, mesmo naquelas em que os genes inatos para a biossíntese do hormônio estejam normalmente reprimidos.

O IPT catalisa a primeira etapa da biossíntese da citocinina

A primeira etapa da biossíntese da citocinina é a transferência do grupo isopentenil do dimetilalil difosfato (DMAPP) para uma parte da molécula de adenosina. Uma enzima que catalisa essa atividade foi primeiramente identificada na matriz celular mucilaginosa de *Dictyostelium discoideum* e, em seguida, foi descoberto que o gene *ipt* da *Agrobacterium* a codificava. Em ambos os casos, o DMAPP e o AMP são convertidos a isopenteniladenosina-5′-monofosfato (iPMP).

Conforme observado, as citocininas também estão presentes nos RNAs transportadores de muitas células, incluindo células vegetais e animais. As citocininas do tRNA são sintetizadas pela modificação de resíduos específicos de adenina no tRNA com-

[1]Os genes de bactérias, ao contrário dos genes vegetais, são grafados com letras minúsculas.

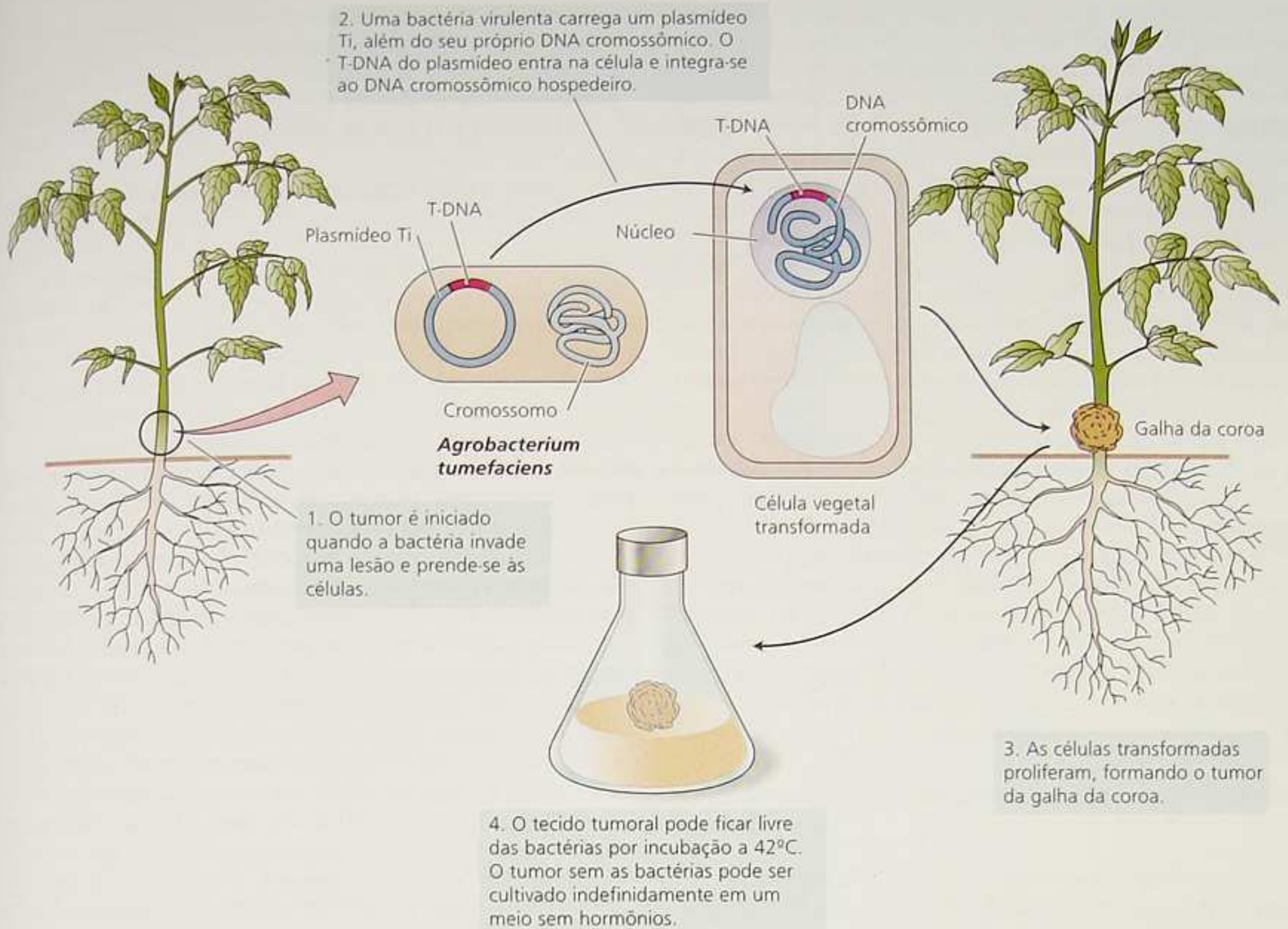



FIGURA 21.4 Indução de tumor pela *Agrobacterium tumefaciens* (Chilton, 1983).

pletamente transcrito. Assim como nas citocininas livres, os grupos isopentenil são transferidos para a molécula de adenina a partir do DMAPP por uma enzima chamada tRNA-IPT. Os genes do tRNA-IPT têm sido clonados em muitas espécies.

A possibilidade das citocininas livres derivarem-se do tRNA tem sido explorada exaustivamente. Embora as citocininas ligadas ao tRNA possam agir como sinalizadores hormonais vegetais, quando esse tRNA é degradado e adicionado diretamente às células, é improvável que qualquer quantidade significativa da citocinina livre seja derivada da degradação desse tRNA.

Uma enzima com atividade de IPT foi identificada em extratos brutos de vários tecidos vegetais. Porém, não foi possível purificar essa proteína do homogeneizado. Recentemente, os genes *IPT* dos vegetais foram clonados após a análise do genoma de *Arabi-*

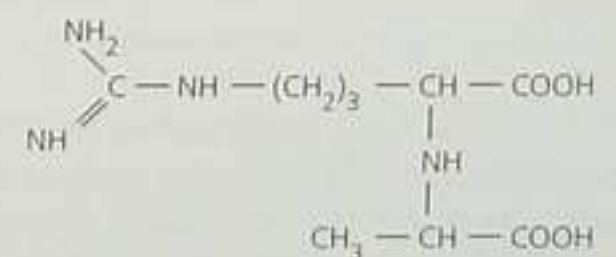
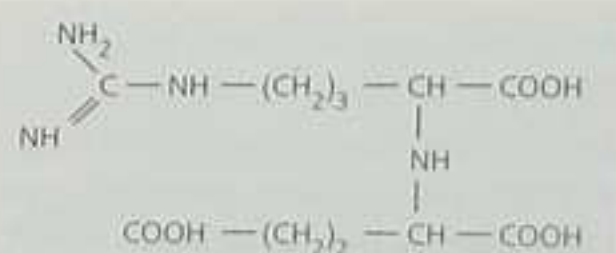



FIGURA 21.5 As duas opinas principais, octopina e nopalina, são encontradas somente nos tumores da galha da coroa. Os genes necessários para a sua síntese estão presentes no T-DNA da *Agrobacterium tumefaciens*. A bactéria, mas não a planta, pode utilizar as opinas como uma fonte de nitrogênio.

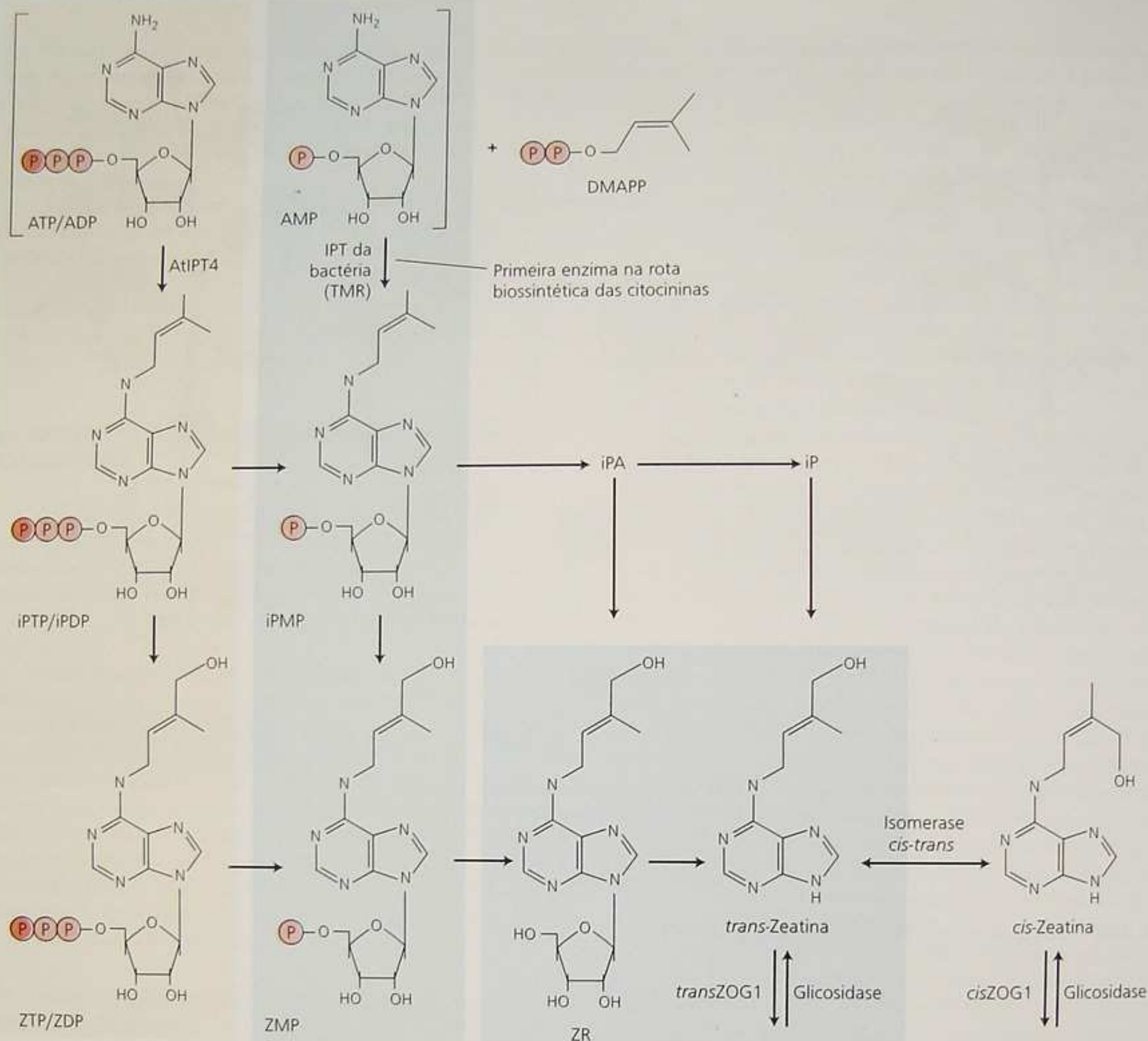



FIGURA 21.6 Rota biossintética para a síntese de citocinina. O primeiro passo na biossíntese de citocinina é a adição da cadeia lateral de isopentenil do DMAPP a uma parte da molécula de adenosina. As enzimas IPT do vegetal e da bactéria diferem no substrato de adenosina utilizado; a enzima vegetal parece utilizar o ADP e o ATP, e a enzima bacteriana emprega o AMP. Os produtos dessas reações (iPMP, iPDP ou iPTP) são convertidos a zeatina por uma hidroxilase desconhecida. As várias formas fosforiladas podem ser interconvertidas e a *trans*-zeatina livre pode ser formada a partir da ribose por enzimas do metabolismo geral da purina. A *trans*-zeatina pode ser metabolizada de várias maneiras conforme mostrado e tais reações são catalisadas pelas enzimas indicadas.

dopsis para possíveis seqüências semelhantes ao *ipt* (Kakimoto, 2001; Takei e cols., 2001). Nove genes *IPT* diferentes foram identificados em *Arabidopsis* — muito mais do que os presentes no genoma de animais, os quais em geral tem apenas um ou dois desses genes utilizados na modificação do tRNA.

Análises filogenéticas revelaram que um dos genes *IPT* de *Arabidopsis* é semelhante ao *ipt*-tRNA de bactéria, um outro assemelha-se ao *IPT*-tRNA dos eucariontes e outros sete formam um grupo ou clado distinto, junto com outras seqüências vegetais (ver **Tópico 21.6 na Internet**). A disposição dos sete genes *IPT* de *Arabidopsis* em um único clado vegetal fornece uma indicação que esses genes podem codificar enzimas da biossíntese de citocinina.

As proteínas codificadas por esses genes foram expressas e analisadas em *E. coli*. Foi descoberto que, com exceção dos genes

mais proximamente relacionados com os genes *IPT*-tRNA dos animais, tais genes codificam proteínas capazes de sintetizar citocininas livres. Entretanto, ao contrário das suas correspondentes em bactérias, as enzimas de *Arabidopsis* têm sido analisadas utilizando-se ATP e ADP preferencialmente ao AMP (ver Figura 21.6).

As citocininas da raiz são transportadas para a parte aérea via xilema

Os meristemas dos ápices das raízes são as regiões da planta de maior síntese de citocininas livres. As citocininas sintetizadas nas raízes parecem se mover pelo xilema até a parte aérea, juntamente com a água e os sais minerais absorvidos pelas raízes. Esta via de movimento da citocinina tem sido inferida a partir da análise de exsudados do xilema.

Quando a parte aérea de uma planta enraizada é cortada próximo ao solo, a seiva do xilema pode continuar fluindo da parte cortada por algum tempo. Esse exsudado do xilema possui citocininas. Se o solo que cobre as raízes é mantido úmido, o fluxo do exsudado do xilema pode continuar por vários dias. Visto que o conteúdo de citocinina no exsudado do xilema não diminui, as citocininas encontradas nestes exsudados são provavelmente sintetizadas pelas raízes. Além disso, os fatores ambientais que interferem no funcionamento da raiz, como o estresse hídrico, reduzem o conteúdo de citocinina no exsudado do xilema (Itai e Vaadia, 1971). De modo recíproco, o fornecimento de nitrogênio para raízes de milho, deficientes nesse nutriente, resulta na elevação dos níveis de citocininas na seiva do xilema (Samuelson 1992), o que foi correlacionado com uma indução da expressão de genes regulados por citocininas na parte aérea (Takei e cols., 2001).

Embora a presença de citocininas no xilema esteja bem-estabelecida, experimentos recentes de enxertia têm suscitado dúvidas quanto ao suposto papel desta citocinina proveniente da raiz no desenvolvimento da parte aérea. Plantas de tabaco transformadas por *Agrobacterium* com um gene *ipt* mostraram aumento no crescimento de gemas laterais e retardo da senescência.

Para avaliar a função da citocinina originada na raiz, o porta-enxerto geneticamente modificado de tabaco para a superprodução de citocinina foi enxertado com uma parte aérea do tipo selvagem. Surpreendentemente, nenhuma conseqüência fenotípica foi observada na parte aérea, embora um aumento na concentração de citocinina foi detectada na corrente de transpiração (Faiss e cols., 1997). Assim, o excesso de citocininas nas raízes não apresentou efeito na parte aérea enxertada.

As raízes não são as únicas partes da planta capazes de sintetizar citocininas. Por exemplo, os embriões jovens de milho sintetizam citocininas, assim como as folhas jovens em desenvolvimento, os frutos jovens e possivelmente muitos outros tecidos. É óbvio que futuros estudos serão necessários para elucidar as funções das citocininas transportadas a partir das raízes *versus* a citocinina sintetizada na parte aérea.

Um sinal da parte aérea regula o transporte de zeatina ribosídeo a partir das raízes

As citocininas presentes no exsudado do xilema estão principalmente na forma de zeatina ribosídeo. Uma vez que tais nucleosídeos tenham atingido as folhas, alguns são convertidos à forma base-livre ou a glicosídeos (Noodén e Letham, 1993). As citocininas glicosídeos podem se acumular em altos níveis em sementes e folhas, podendo estar presentes quantidades substanciais mesmo em folhas senescentes. Embora os glicosídeos sejam ativos como citocininas em bioensaios, muitas vezes eles não apresentam atividade hormonal após terem sido produzidos nas células, possivelmente por que estejam compartimentados de forma a permanecerem indisponíveis. Essa possibilidade pode explicar as observações controversas de que as citocininas são transportadas rapidamente pelo xilema, mas as citocininas radioativas aplicadas a folhas de plantas intactas parecem não se mover do local de aplicação.

As evidências dos experimentos de enxertia com mutantes sugerem que o transporte da zeatina ribosídeo da raiz para a parte aérea é regulado por sinais produzidos na parte aérea. O mutante *rms4* de ervilha (*Pisum sativum* L.) é caracterizado por um decréscimo de 40 vezes na concentração da zeatina ribosídeo na seiva do xilema das raízes. No entanto, quando se enxerta a parte aérea do tipo selvagem em um porta-enxerto mutante *rms4* ocorre um aumento nos níveis da zeatina ribosídeo no exsudado do xilema, aos níveis existentes nas plantas selvagens. De modo inverso, enxertando uma parte aérea do mutante *rms4* em uma raiz do tipo selvagem, houve uma diminuição da concentração da zeatina ribosídeo no exsudado do xilema aos níveis do mutante (Beveridge e cols., 1997).

Tais resultados sugerem que um sinal da parte aérea pode regular o transporte de citocininas a partir das raízes. A identidade desse sinal ainda não foi determinada.

As citocininas são rapidamente metabolizadas nos tecidos vegetais

As citocininas livres são rapidamente convertidas em suas respectivas formas nucleosídeo e nucleotídeo. Tais interconversões provavelmente envolvem enzimas comuns ao metabolismo das purinas.

Muitos tecidos vegetais possuem a enzima **citocinina oxidase**, a qual cliva a cadeia lateral da zeatina (ambas *cis* e *trans*), da zeatina ribosídeo, do iP e de seus N-glicosídeos, mas não cliva seus derivados *O*-glicosídeos (Figura 21.7). Entretanto, a diidrozeatina e seus conjugados são resistentes à clivagem. A citocinina oxidase inativa irreversivelmente as citocininas, podendo ser importante na regulação ou na limitação dos efeitos da citocinina. A atividade da enzima é induzida por altas concentrações de citocinina devido, pelo menos em parte, ao aumento dos níveis do RNA de um subgrupo de genes.

iP — Citocinina oxidase, O_2 → Adenina + 3-Metil-2-butanal

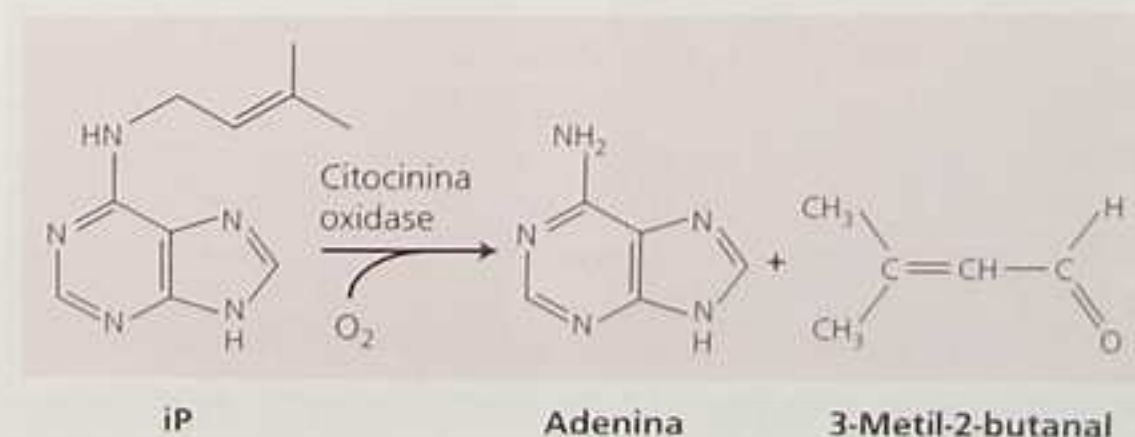



FIGURA 21.7 A citocinina oxidase degrada irreversivelmente algumas citocininas.

Um gene que codifica a citocinina oxidase foi primeiramente identificado em milho (Houba-Herin e cols., 1999; Morris e cols., 1999). Em *Arabidopsis*, a citocinina oxidase é codificada por uma família multigênica, cujos membros apresentam padrões distintos de expressão. Curiosamente, vários dos genes possuem sinais secretores putativos, sugerindo que pelo menos algumas dessas enzimas possam ser extracelulares.

Os níveis de citocinina podem também ser regulados pela conjugação do hormônio em várias posições. Os nitrogênios nas posições 3, 7 e 9 do anel da adenina da citocinina podem ser conjugados a resíduos de glicose. A alanina também pode ser conjugada ao nitrogênio na posição 9, formando o ácido lupínico. Tais modificações são em geral irreversíveis e tais formas conjugadas de citocininas são inativas em bioensaios, com exceção dos N^3-glicosídeos.

O grupo hidroxila da cadeia lateral das citocininas é também alvo da conjugação com resíduos de glicose ou, em alguns casos, resíduos de xilose, produzindo citocininas *O*-glicosídeo e *O*-xilosídeo. Os *O*-glicosídeos são resistentes à clivagem pelas citocininas oxidases, o que pode explicar por que esses derivados apresentam atividade biológica mais elevada em alguns ensaios do que suas bases livres correspondentes.

As enzimas que catalisam a conjugação da zeatina com a glicose ou com a xilose foram purificadas e seus respectivos genes clonados (Martin e cols., 1999). Tais enzimas apresentam especificidades estritas de substrato para o doador do açúcar e as bases de citocinina. Apenas as bases livres *trans*-zeatina e diidrozeatina são substratos eficientes, os nucleosídeos correspondentes e a *cis*-zeatina não são substratos. A especificidade dessas enzimas sugere que a conjugação com a cadeia lateral é extremamente regulada.

As conjugações da cadeia lateral podem ser removidas por enzimas glicosidases, produzindo citocininas livres, as quais, conforme já tratado, são formas ativas. Assim, as citocininas glicosídeos podem ser uma forma de armazenamento ou um estado metabolicamente inativo desses compostos. Um gene que codifica uma glicosidase que pode liberar as citocininas dos açúcares conjugados foi clonado do milho e sua expressão poderia exercer uma função importante na germinação de sementes de milho (Brzobohaty e cols., 1993).

Com freqüência as sementes dormentes apresentam altos níveis de citocininas glicosídeos, mas níveis muito baixos de citocininas livres com atividade hormonal. No entanto, o nível de citocininas livres aumenta rapidamente com o início da germinação, aumento que é acompanhado por um decréscimo correspondente nas citocininas glicosídeos.

AS FUNÇÕES BIOLÓGICAS DAS CITOCININAS

Embora tenham sido descobertas como fatores da divisão celular, as citocininas podem estimular ou inibir uma variedade de processos fisiológicos, metabólicos, bioquímicos e de desenvolvimento quando aplicadas às plantas superiores, sendo cada vez mais evidente que as citocininas endógenas exercem importante função na regulação destes eventos.

Nesta seção, serão examinados alguns dos diversos efeitos da citocinina no crescimento e no desenvolvimento vegetal, incluindo a discussão do seu papel na regulação da divisão celular. A descoberta do plasmídeo Ti, indutor de tumor, na interação planta-bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, forneceu aos cientistas uma poderosa ferramenta para introduzir genes exógenos em plantas e para estudar a função da citocinina no desenvolvimento. Além de sua ação na proliferação celular, a citocinina afeta muitos outros processos, incluindo diferenciação, dominância apical e senescência.

As citocininas regulam a divisão celular nas partes aéreas e raízes

Conforme foi apresentado, as citocininas são, em geral, necessárias para a divisão das células vegetais *in vitro*. Várias evidências sugerem que as citocininas também exercem funções-chave na regulação da divisão celular *in vivo*.

A grande parte das divisões celulares em uma planta adulta ocorre nos meristemas (ver Capítulo 16). A expressão local do gene *ipt* de *Agrobacterium*, em seções somáticas de folhas de tabaco, promove a formação de meristemas ectópicos (de localização anormal), indicando que o aumento dos níveis de citocinina é suficiente para iniciar as divisões celulares nestas folhas (Estruch e cols., 1991). O aumento dos níveis endógenos de citocinina em plantas transgênicas de *Arabidopsis* resulta na superexpressão do fator de transcrição *homeobox* KNOTTED homólogo ao *KNAT1* e *STM* — genes importantes na regulação da função meristemática (ver Capítulo 16) (Rupp e cols., 1999). Curiosamente, a superexpressão do *KNAT1* também parece elevar os níveis de citocinina em tabaco transgênico, sugerindo uma relação interdependente entre o *KNAT* e os níveis das citocininas.

FIGURA 21.8 Plantas de tabaco superexpressando o gene para citocinina oxidase. A planta da esquerda é o tipo selvagem. As duas plantas da direita estão superexpressando duas construções diferentes do gene de *Arabidopsis* da citocinina oxidase: *AtCKX1* e *AtCKX2*. O crescimento da parte aérea é fortemente inibido nas plantas transgênicas (Werner e cols., 2001).

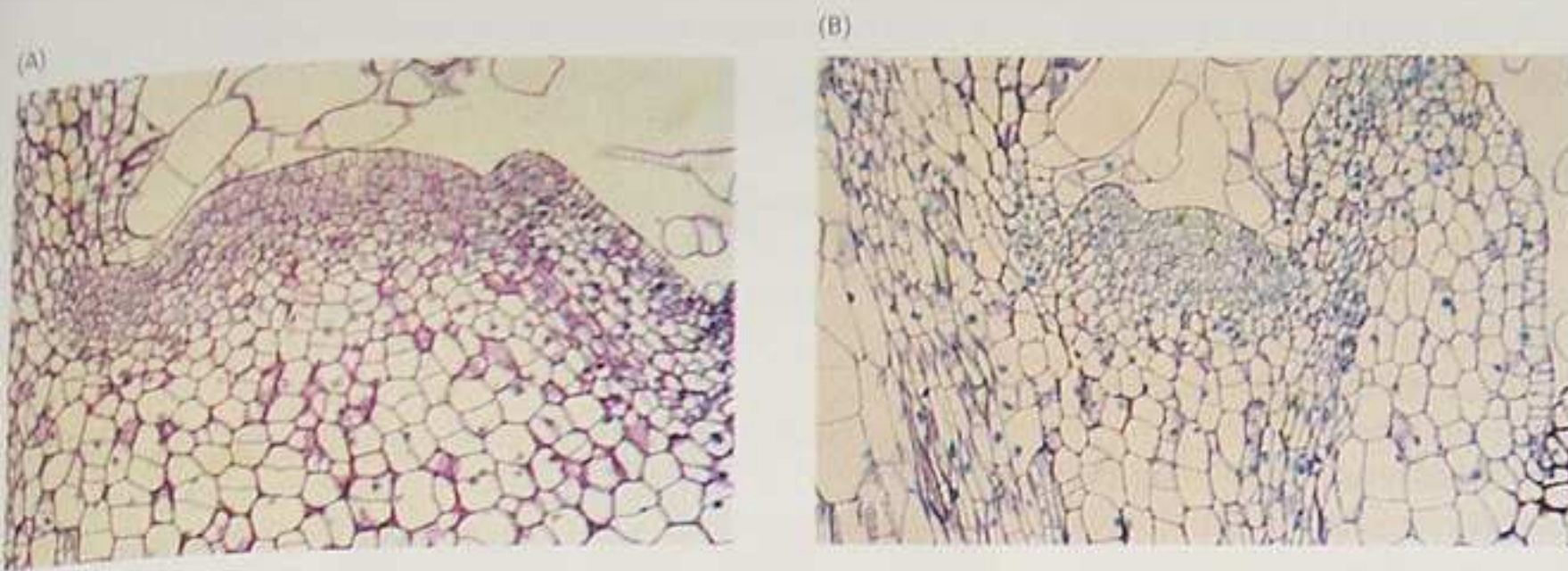



FIGURA 21.9 A citocinina é necessária para o crescimento normal do meristema apical da parte aérea. (A) Secção longitudinal do meristema apical da parte aérea de uma planta de tabaco selvagem. (B) Seção longitudinal do meristema apical da parte aérea de uma planta de tabaco transgênica, superexpressando o gene que codifica a citocinina oxidase (*AtCKX1*). Observe a redução no tamanho do meristema apical da planta com deficiência de citocinina (Werner e cols., 2001).

A superexpressão de vários genes da citocinina oxidase, de *Arabidopsis* em tabaco, resulta na redução dos níveis endógenos de citocinina e, conseqüentemente, um grande retardo do desenvolvimento, devido à redução na taxa de proliferação celular no meristema apical da parte aérea (Figuras 21.8 e 21.9) (Werner e cols., 2001). Esta descoberta apóia fortemente a hipótese de que as citocininas endógenas regulam a divisão celular *in vivo*.

De modo surpreendente, a mesma superexpressão da citocinina oxidase em tabaco leva a uma *intensificação* do crescimento radicular (ver Glossário) (Figura 21.10), sobretudo pelo aumento do tamanho do meristema apical da raiz (Figura 21.11). Visto que a raiz é a principal fonte de citocinina, o resultado pode indicar que as citocininas exercem funções opostas na regulação da proliferação celular nos meristemas da raiz e da parte aérea.

Da análise de mutações no receptor de citocinina (o qual será examinado posteriormente neste capítulo) surgiu uma linha adicional de evidências, correlacionando a citocinina à regulação da divisão celular *in vivo*. As mutações no receptor de citocinina interrompem o desenvolvimento da vascularização da raiz. Conhecidos como *cre1*, esses mutantes não apresentam floema em suas raízes; o sistema vascular da raiz é composto quase que inteiramente de xilema (ver Capítulos 4 e 10).

Análises adicionais revelaram que esse defeito deve-se a um número insuficiente de células iniciais de vascularização, ou seja, no momento da diferenciação do xilema e do floema, o conjunto de células iniciais é anormalmente pequeno nos mutantes *cre1*; todas as células tornam-se comprometidas na formação do xilema e não sobram células iniciais para formar o floema. Tais resultados

FIGURA 21.10 A citocinina inibe o crescimento de raízes. As raízes *AtCKX1* deficientes em citocinina (direita) são maiores que aquelas das plantas de tabaco selvagem (esquerda) (Werner e cols., 2001).

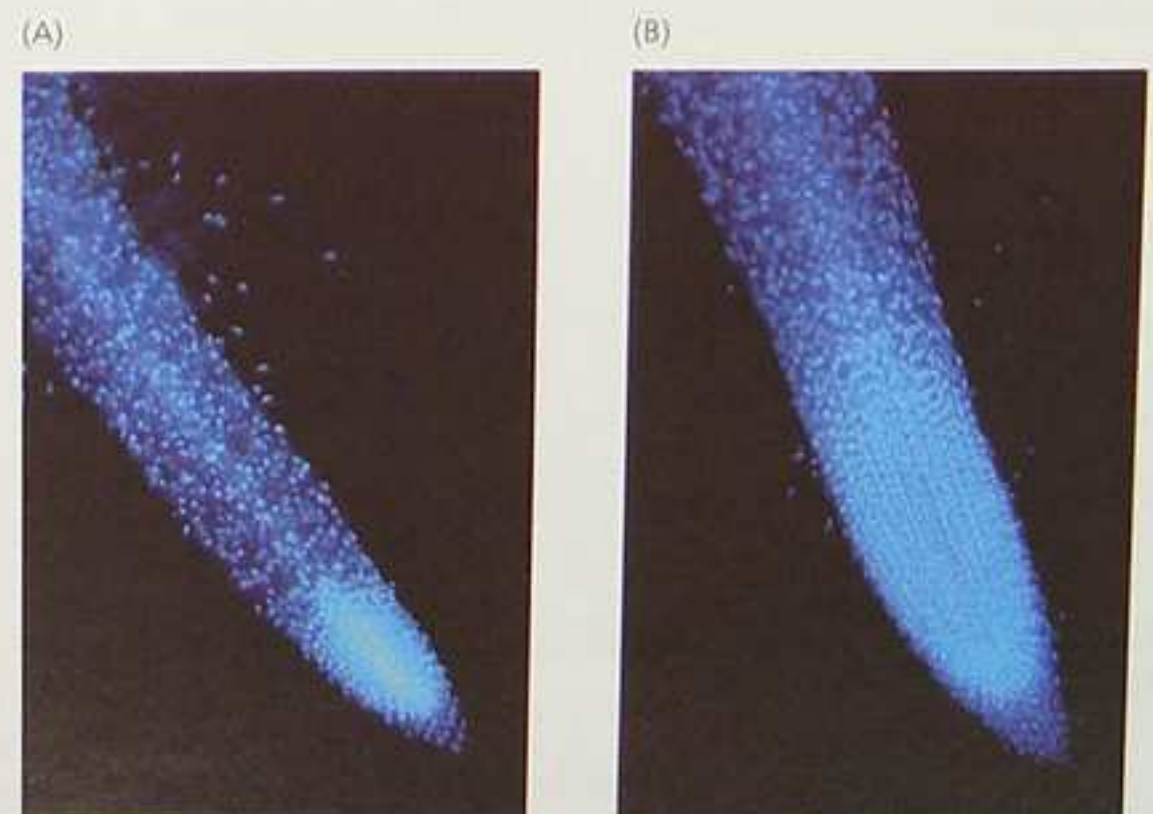



FIGURA 21.11 A citocinina inibe o crescimento e a divisão celular das raízes. (A) Tipo selvagem. (B) *AtCKX1*. Essas raízes foram coradas com fluorescente 4', 6-diamidino-2-fenilindol, que cora os núcleos (Werner e cols., 2001).

indicam que a citocinina desempenha um papel-chave na regulação da proliferação de células iniciais de vascularização da raiz.

As citocininas regulam componentes específicos do ciclo celular

As citocininas regulam a divisão celular agindo nos controles que governam a passagem da célula pela divisão celular. Ocorre um pico na concentração de zeatina nas culturas de células de tabaco sincronizadas, no final da fase S, na mitose e na fase G1.

As citocininas foram descobertas quanto à sua capacidade para estimular a divisão celular em tecidos suplementados com níveis adequados de auxina. Evidências sugerem que a auxina e as citocininas participam na regulação do ciclo celular pelo controle da atividade das quinases dependentes de ciclina. Conforme apresentado no Capítulo 1, as *proteínas quinases dependentes de ciclina* (*CDKs*), em combinação com suas subunidades reguladoras, as *ciclinas*, são as enzimas que regulam o ciclo celular em eucariontes.

A expressão do gene que codifica a maioria das CDK, o Cdc2 (*c*iclo de *d*ivisão *c*elular *2*), é regulada pela auxina (ver Capítulo 19). Em tecidos de raiz de ervilha, o mRNA do *CDC2* foi induzido 10 minutos após o tratamento com auxina e altos níveis de CDK são produzidos em medula de tabaco, quando esta é cultivada em meio contendo auxina (John e cols., 1993). Contudo, a CDK induzida pela auxina é enzimaticamente inativa e apenas altos níveis de CDK não são suficientes para permitir a divisão celular.

A citocinina tem sido relacionada à ativação de uma enzima semelhante à fosfatase, Cdc25, cujo papel é remover um grupo fosfato inibitório da quinase Cdc2 (Zhang e cols., 1996). Tal ação da citocinina indica uma possível conexão entre a citocinina e a auxina na regulação do ciclo celular.

Recentemente, ocorreu a segunda maior descoberta relacionada à regulação do ciclo celular pela citocinina. As citocininas aumentam a expressão do gene *CYCD3*, que codifica uma *ciclina tipo D* (Soni e cols., 1995; Riou-Khamlichi e cols., 1999). Em células animais, as ciclinas tipo D são reguladas por uma grande variedade de fatores de crescimento e exercem uma função-chave na regulação da passagem pelo ponto de restrição do ciclo celular em G1. As ciclinas tipo D são, assim, participantes-chave na regulação da proliferação celular.

Em *Arabidopsis*, o gene *CYCD3* é expresso nos tecidos em proliferação como meristemas apicais das partes aéreas e primórdios foliares. Em um experimento decisivo foi demonstrado que a superexpressão de *CYCD3* pode substituir a necessidade de citocinina para a proliferação celular em cultura (Figura 21.12) (Riou-Khamlichi e cols., 1999). Estes e outros resultados sugerem que o principal mecanismo para a capacidade da citocinina em estimular a divisão celular está relacionada ao seu aumento da função do *CYCD3*.

A razão auxina:citocinina regula a morfogênese de tecidos em cultura

Logo após a descoberta da cinetina, foi observado que a diferenciação de calos, obtidos a partir de segmentos da medula de tabaco, em raízes ou em partes aéreas, depende da razão de auxina:citocinina no meio de cultura. Enquanto uma alta razão auxina:citocinina estimula a formação de raízes, uma baixa razão leva à formação de parte aérea. Em níveis intermediários, o tecido cresce como um calo indiferenciado (Figura 21.13) (Skoog e Miller, 1965).

O efeito da razão auxina:citocinina na morfogênese também pode ser observado nos tumores da galha da coroa obtidos pela mutação do T-DNA do plasmídeo Ti da *Agrobacterium* (Garfinkel e cols., 1981). A mutação do gene *ipt* (o locus *tmr*) do plasmídeo Ti

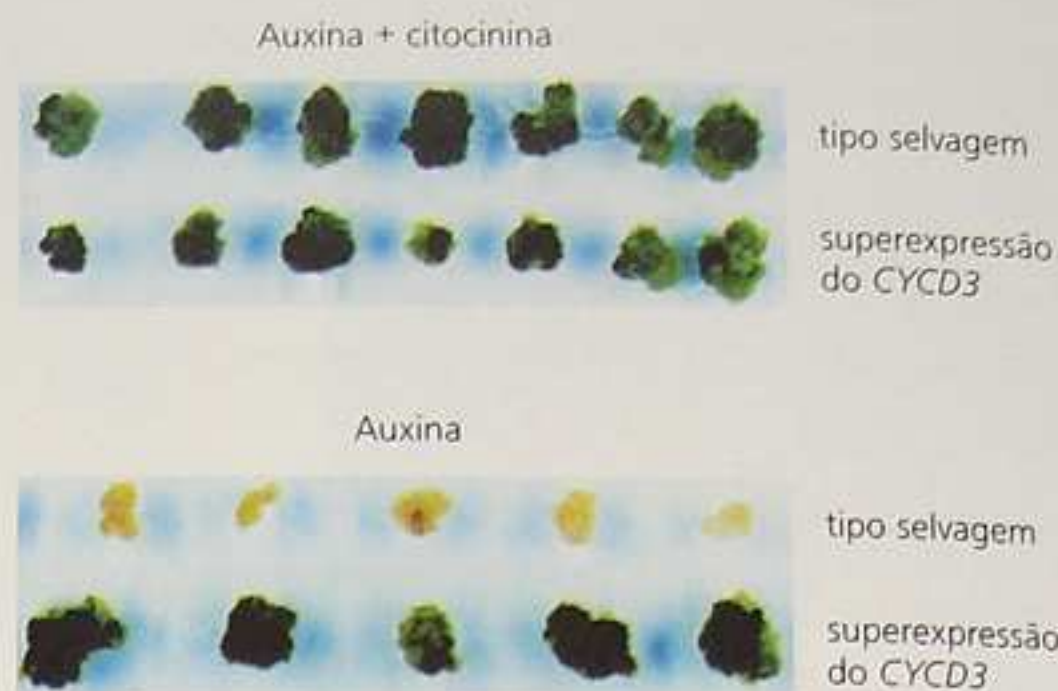



FIGURA 21.12 As células de calos expressando o gene *CYCD3* podem se dividir na ausência de citocinina. Os explantes foliares de plantas transgênicas de *Arabidopsis*, que expressam o gene *CYCD3* sob controle do promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, foram induzidos a formar calos pelo cultivo em presença de auxina e citocinina, ou somente de auxina. Os calos-controle, tipo selvagem, necessitam de citocinina para crescerem. Os calos expressando *CYCD3* cresceram em meio contendo somente auxina. As fotografias foram obtidas após 29 dias (Riou-Khamlichi e cols., 1999).

FIGURA 21.13 Regulação do crescimento e da formação de órgãos em calos de tabaco cultivados em diferentes concentrações de auxina e cinetina. Em baixas concentrações de auxina e altas de cinetina (inferior esquerda) ocorre a formação de gemas. Já em altas concentrações de auxina e baixas de cinetina (superior direita) dá-se a formação de raízes. Em concentrações intermediárias ou altas de ambos os hormônios (no centro e inferior direita), há o desenvolvimento de calos não-diferenciados (cedida por Donald Armstrong).

bloqueia a biossíntese de zeatina nas células infectadas. A alta razão auxina:citocinina resultante nas células do tumor causa a proliferação de raízes em vez de calos indiferenciados. Por outro lado, a mutação em qualquer um dos genes para a biossíntese da auxina (locus *tms*) promove uma diminuição da razão auxina:citocinina, estimulando a proliferação de partes aéreas (Figura 21.14) (Akiyoshi e cols., 1983). Esses tumores parcialmente diferenciados são conhecidos como teratomas.

As citocininas modificam a dominância apical e promovem o crescimento de gemas laterais

Um dos principais determinantes da forma vegetal é o grau de dominância apical (ver Capítulo 19). As plantas com forte dominância apical, como milho, apresentam um único eixo de crescimento com poucas ramificações laterais. Por outro lado, em plantas arbustivas, ocorre o crescimento de muitas gemas laterais.

Embora a dominância apical possa ser determinada inicialmente pela auxina, os estudos de fisiologia indicam que as citocininas desempenham um papel no crescimento inicial das gemas laterais. Por exemplo, aplicações diretas de citocininas em gemas axilares de muitas espécies estimulam a divisão celular e o crescimento dessas gemas.

Os fenótipos de mutantes com superexpressão de citocininas são consistentes com tais resultados. Tipos selvagens de tabaco apresentam forte dominância apical durante o desenvolvimento vegetativo enquanto que as gemas laterais das plantas superprodutoras de citocinina crescem vigorosamente e desenvolvem brotos que competem com o ramo principal. Conseqüentemente, as plantas superprodutoras de citocinina tendem a ter mais ramificações.

As citocininas induzem a formação de gemas em musgos

A discussão sobre hormônios vegetais tem ficado restrita às angiospermas. No entanto, muitos hormônios vegetais estão presentes e agem no desenvolvimento de várias espécies do reino vegetal. O musgo *Funaria hygrometrica* é um exemplo bem-estudado. A germinação dos esporos deste musgo origina um filamento de células denominado *protonema*. O protonema alonga, sofre divisões celulares no ápice e forma ramificações a alguma distância da extremidade (ver **Ensaio 21.1 na Internet**).

A transição do crescimento filamentoso para o crescimento folhoso inicia com a formação de um intumescimento ou protuberância próximo às extremidades apicais de células específicas (Figura 21.15). Segue-se uma divisão assimétrica originando a **célula inicial**, a qual se divide por mitose para produzir a **gema**, estrutura que dará origem ao gametófito folhoso. Durante o crescimento normal, as gemas e os ramos são originados com regularidade, em geral iniciando na terceira célula a partir da extremidade do filamento.

A luz, em especial a luz vermelha, é necessária para a formação da gema em *Funaria*. No escuro, as gemas não se desenvolvem, mas a adição de citocinina ao meio pode substituir a necessidade de luz. A citocinina não somente estimula o desenvolvimento normal da gema; ela aumenta também o número total de gemas (Figura 21.16). Mesmo em baixos níveis de citocinina (pico-

Formação de partes aéreas em tumores pela mutação ou deleção do *tms*

Produção de raízes em tumores pela mutação ou deleção do *tmr*

Produção de tumores grandes e indiferenciados pela mutação ou deleção do *tml*

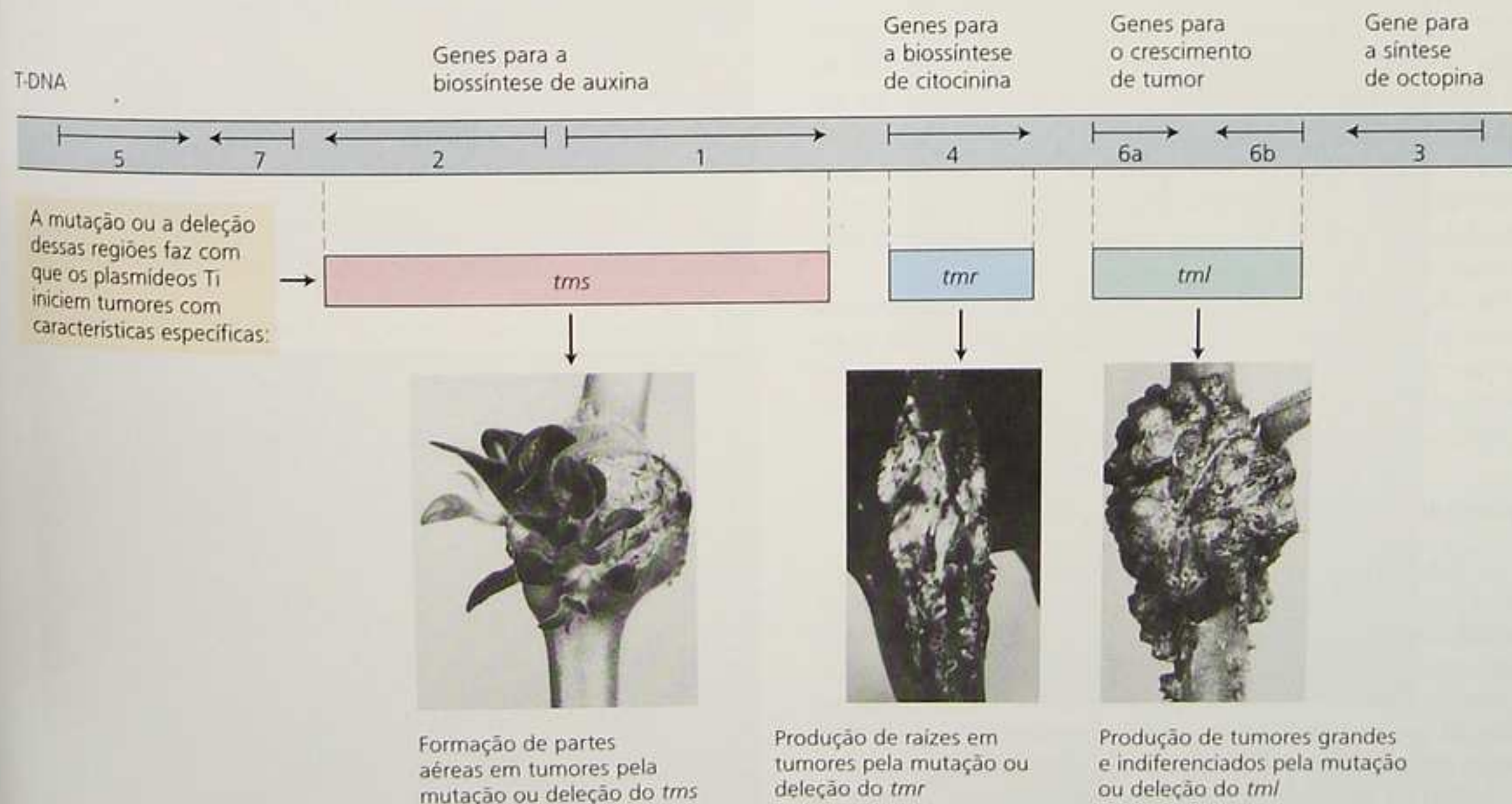



FIGURA 21.14 Mapa do T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium* apresentando os efeitos das mutações do T-DNA na morfologia dos tumores da galha da coroa. Os genes 1 e 2 codificam duas enzimas envolvidas na biossíntese de auxina; o gene 4 codifica uma enzima da biossíntese de citocinina. As mutações nestes genes produzem os fenótipos ilustrados (Morris, 1986; cedidas por R. Morris).

(A) (B) (C) (D)

25 µm

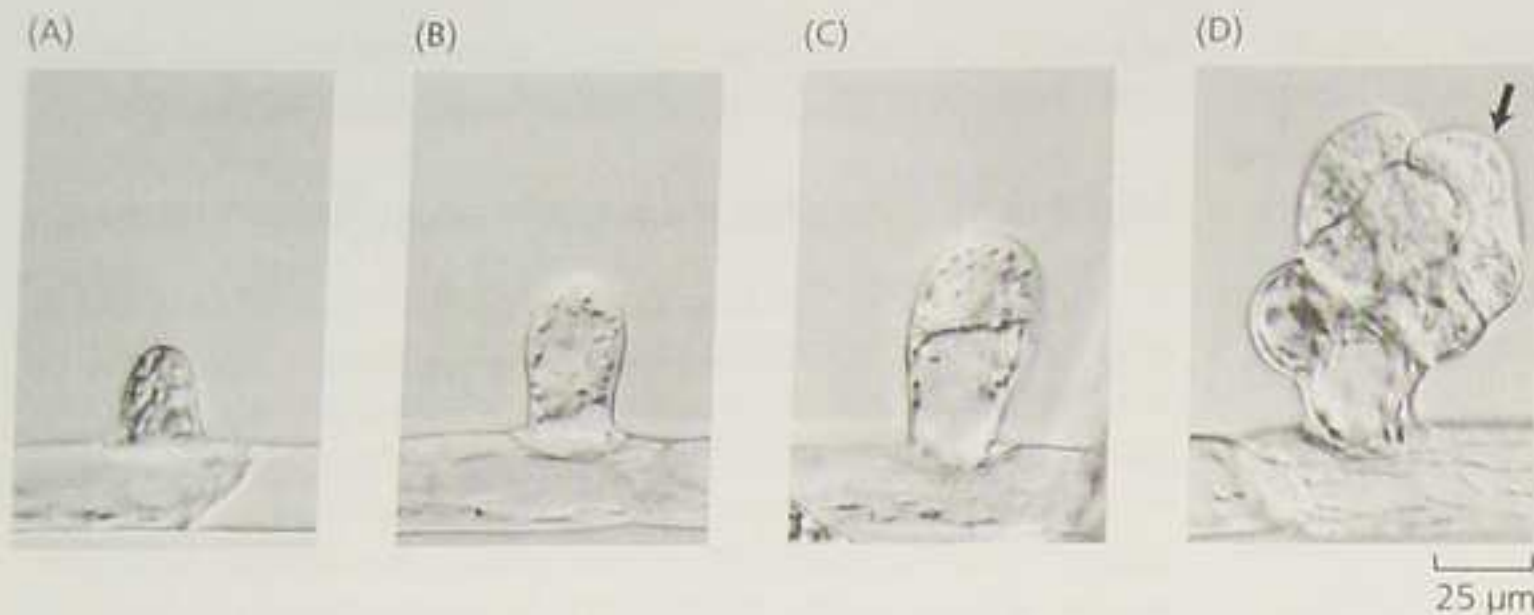



FIGURA 21.15 A formação da gema no musgo *Funaria* inicia com o desenvolvimento de uma protuberância na extremidade apical de certas células do protonema filamentoso. A-D apresentam vários estádios do desenvolvimento da gema. Uma vez formada, a gema prossegue na produção do gametófito folhoso dos musgos (cedida por K. S. Schumaker).

molar ou 10^{-12} *M*) pode estimular a primeira etapa na formação da gema: o intumescimento de uma célula específica na extremidade apical do protonema.

A superprodução de citocinina tem sido relacionada aos tumores genéticos

Muitas espécies do gênero *Nicotiana* podem ser cruzadas para produzir híbridos interespecíficos. Mais de 300 híbridos interespecíficos têm sido produzidos; dos quais 90% são normais, exibindo características fenotípicas intermediárias entre aquelas dos parentais. A planta utilizada para tabaco de cigarro, a *Nicotiana tabacum*, por exemplo, é um híbrido interespecífico. Contudo, cerca de 10% dos cruzamentos interespecíficos resultam em uma progênie que tende a formar tumores espontâneos chamados de **tumores genéticos** (Figura 21.17) (Smith, 1988).

Os tumores genéticos são morfologicamente semelhantes àqueles induzidos pela *Agrobacterium tumefaciens*, discutidos no início deste capítulo, mas são formados espontaneamente na ausência de qualquer agente indutor externo. Os tumores são constituídos por massas de células que crescem com rapidez nas regiões que normalmente conteriam poucas células em divisão. Além disso, as células dividem-se de maneira indiferenciada nos tipos celulares associados ao tecido que deu origem ao tumor.

Os híbridos de *Nicotiana*, que produzem tumores genéticos, apresentam níveis anormalmente elevados tanto de auxina quanto de citocinina. Tipicamente, os níveis de citocinina nos híbridos pré-dispostos a tumores são cinco a seis vezes mais elevados do que aqueles encontrados em cada parental.

As citocininas retardam a senescência foliar

As folhas destacadas de uma planta perdem lentamente a clorofila, o RNA, os lipídeos e as proteínas, mesmo se elas forem mantidas úmidas e supridas de minerais. Tal processo de envelhecimento programado, que leva à morte do vegetal é denominado **senescência** (ver Capítulos 16 e 23). A senescência foliar é mais rápida no escuro do que na luz. O tratamento de folhas isoladas de muitas espécies com citocininas irão retardar sua senescência.

Embora a aplicação de citocinina não evite por completo a senescência, seus efeitos podem ser drásticos, sobretudo quando a citocinina é pulverizada sobre a planta intacta. Se apenas uma folha é tratada, esta permanece verde depois que as outras folhas, de idade e desenvolvimento semelhantes, tenham amarelado e sofrido abscisão. Mesmo um pequeno ponto em uma folha permanecerá verde, se for tratado com uma citocinina após o tecido adjacente ter iniciado a senescência.

As folhas maduras, ao contrário das folhas jovens, produzem pouca ou nenhuma citocinina, dependendo das citocininas pro-

(A)

(B)

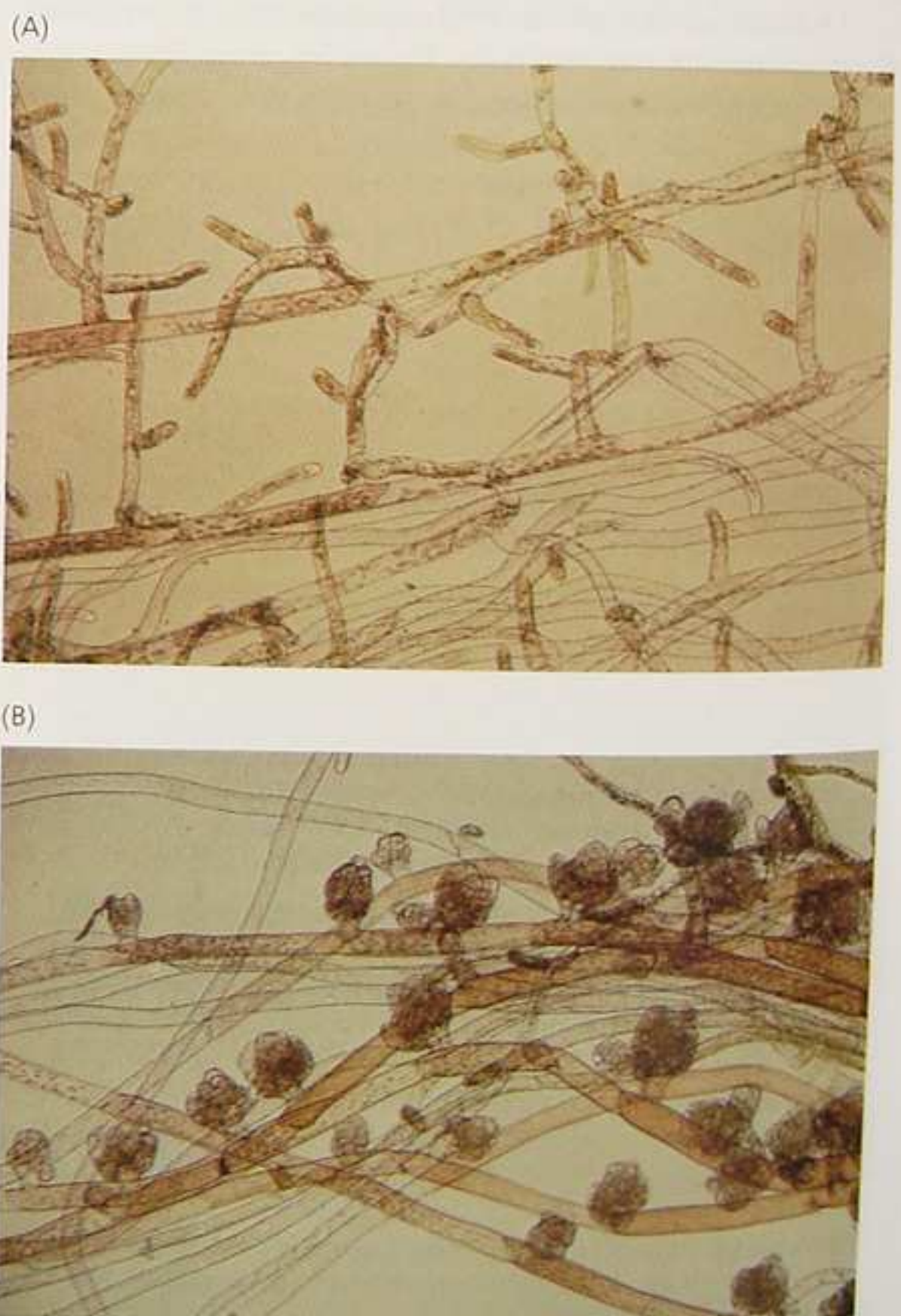



FIGURA 21.16 A citocinina estimula o desenvolvimento de gemas em *Funaria*. (A) Protonema filamentoso-controle. (B) Protonema filamentoso tratado com benziladenina (cedida por H. Kende).

FIGURA 21.17 A expressão de tumores genéticos em um híbrido de *Nicotiana langsdorffii* × *N. glauca* (Smith, 1988).

duzidas nas raízes para adiar sua senescência. A senescência foliar é iniciada na soja pela maturação das sementes — um fenômeno conhecido como *senescência monocárpica* — e pode ser retardada pela remoção das mesmas. Os legumes determinam o início da senescência pelo controle da distribuição das citocininas procedentes das raízes para as folhas.

As citocininas envolvidas no atraso da senescência são sobretudo a zeatina ribosídeo e a diidrozeatina ribosídeo, as quais podem ser transportadas para as folhas a partir das raízes através do xilema, juntamente com a corrente de transpiração (Noodén e cols., 1990).

Para testar o papel da citocinina na regulação do início da senescência foliar, plantas de tabaco foram transformadas com um gene quimérico, no qual um promotor específico para senescência foi utilizado para acionar a expressão do gene *ipt* (Gan e Amasino, 1995). As plantas transformadas exibem níveis de citocininas comparáveis ao tipo selvagem e se desenvolveram normalmente até o início da senescência foliar.

Entretanto, à medida que as folhas envelheceram, o promotor específico da senescência foi ativado, desencadeando a expressão do gene *ipt* nas células da folha, assim que o processo de senescência iniciou. Os altos níveis de citocininas resultantes não só bloquearam a senescência, mas também inibiram a expressão posterior do gene *ipt*, impedindo a superprodução de citocinina (Figura 21.18). Esse resultado indica que as citocininas são reguladores naturais da senescência foliar.

As citocininas promovem o movimento dos nutrientes

As citocininas influenciam o movimento de nutrientes para a folha a partir de outras partes da planta, um fenômeno conhecido como *mobilização de nutrientes induzida por citocinina*. Este processo é demonstrado quando nutrientes (açúcares, aminoácidos e outros) marcados com C^{14} ou H^{3} são fornecidos aos vegetais, após o tratamento de uma folha, ou parte da folha, com citocinina. Posteriormente, toda a planta é submetida à auto-radiografia, que revela o padrão de movimento e os locais nos quais os nutrientes marcados se acumularam.

Experimentos dessa natureza demonstraram que os nutrientes são preferencialmente transportados e acumulados em tecidos tratados com citocininas. Tem sido sugerido que o hormônio causa a mobilização de nutrientes, originando uma nova relação fonte-dreno. Conforme discutido no Capítulo 10, os nutrientes translocados no floema deslocam-se de um local de produção ou

FIGURA 21.18 A senescência foliar é retardada em uma planta transgênica de tabaco contendo o gene *ipt*, para a biossíntese da citocinina. O gene *ipt* é expresso em resposta aos sinais que induzem a senescência (Gan e Amasino, 1995, cedida por R. Amasino).

armazenamento (a fonte) para um local de utilização (o dreno). O metabolismo da área tratada com citocinina pode ser estimulado fazendo com que os nutrientes desloquem-se em direção a esta região. Entretanto, não é necessário que os nutrientes sejam metabolizados nas células-dreno, pois mesmo os substratos análogos não-metabolizáveis são também mobilizados pelas citocininas (Figura 21.19).

As citocininas promovem o desenvolvimento de cloroplastos

Embora as sementes possam germinar no escuro, a morfologia das plântulas que crescem na ausência da luz é muito diferente daquelas que crescem na luz (ver Capítulo 17). As plântulas que crescem no escuro são ditas estioladas. O hipocótilo e os entrenós de plântulas estioladas são mais alongados, os cotilédones e as folhas não expandem e os cloroplastos não se desenvolvem. Em vez de se desenvolver como cloroplastos, os proplastídeos das plantas no escuro desenvolvem-se em **estioplastos**, os quais não sintetizam clorofila nem a maioria das enzimas e proteínas estruturais necessárias para a formação do sistema de tilacóides do cloroplasto e do sistema fotossintético. Quando as plântulas germinam na luz, os cloroplastos se desenvolvem diretamente a partir dos proplastídeos presentes no embrião. Os estioplastos podem também se desenvolver em cloroplastos, quando plântulas estioladas são iluminadas.

Se as folhas estioladas forem tratadas com citocinina antes de serem iluminadas, elas formarão cloroplastos com *grana* mais amplos e tanto a clorofila quanto as enzimas fotossintéticas serão sintetizadas em uma maior taxa sob iluminação (Figura 21.20). Tais resultados sugerem que as citocininas — junto com outros fatores, tais como luz, nutrição e desenvolvimento — regulam a síntese dos pigmentos e proteínas fotossintéticas. A capacidade da citocinina exógena em promover a reversão do estiolamento de plântulas no escuro é mimetizada por algumas mutações que levam à superprodução de citocinina (para mais detalhes de como as citocininas promovem o desenvolvimento mediado pela luz, ver Tópico 21.7 na Internet).

As citocininas promovem a expansão celular em folhas e cotilédones

A promoção da expansão celular pelas citocininas é claramente demonstrada em cotilédones folhosos de dicotiledôneas, como mostarda, pepino e girassol. Os cotilédones dessas espécies expandem-se como resultado do aumento celular durante o crescimento das plântulas. O tratamento com citocinina promove uma expansão celular adicional, sem aumentar o peso seco dos cotilédones tratados.

Os cotilédones folhosos expandem-se muito mais quando as plântulas são crescidas na luz do que no escuro e as citocininas promovem o crescimento dos cotilédones das plantas mantidas tanto na presença quanto na ausência de luz (Figura 21.21). Assim como a auxina induz o crescimento, a expansão dos cotilédones do rabanete estimulada pela citocinina está associada ao aumento na extensibilidade mecânica da parede celular. Contudo, a indução do afrouxamento da parede celular não é acompanhada pela extrusão de prótons. Nem a auxina nem a giberelina promovem a expansão dos cotilédones.

As citocininas regulam o crescimento de caules e raízes

Embora as citocininas endógenas sejam evidentemente necessárias à proliferação normal das células do meristema apical e, conseqüentemente, ao crescimento normal da parte aérea (ver Figura 21.9), a aplicação de citocininas inibe o processo de alongamento de caules e de raízes. Por exemplo, as citocininas exógenas inibem

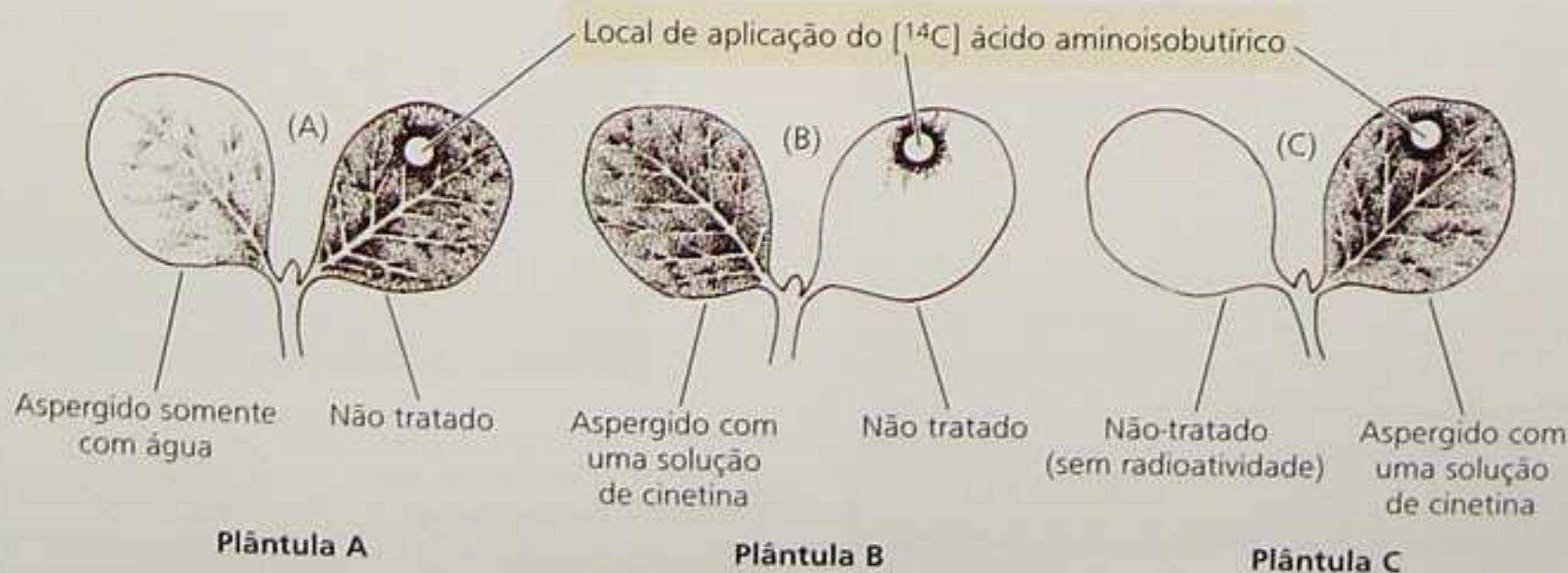
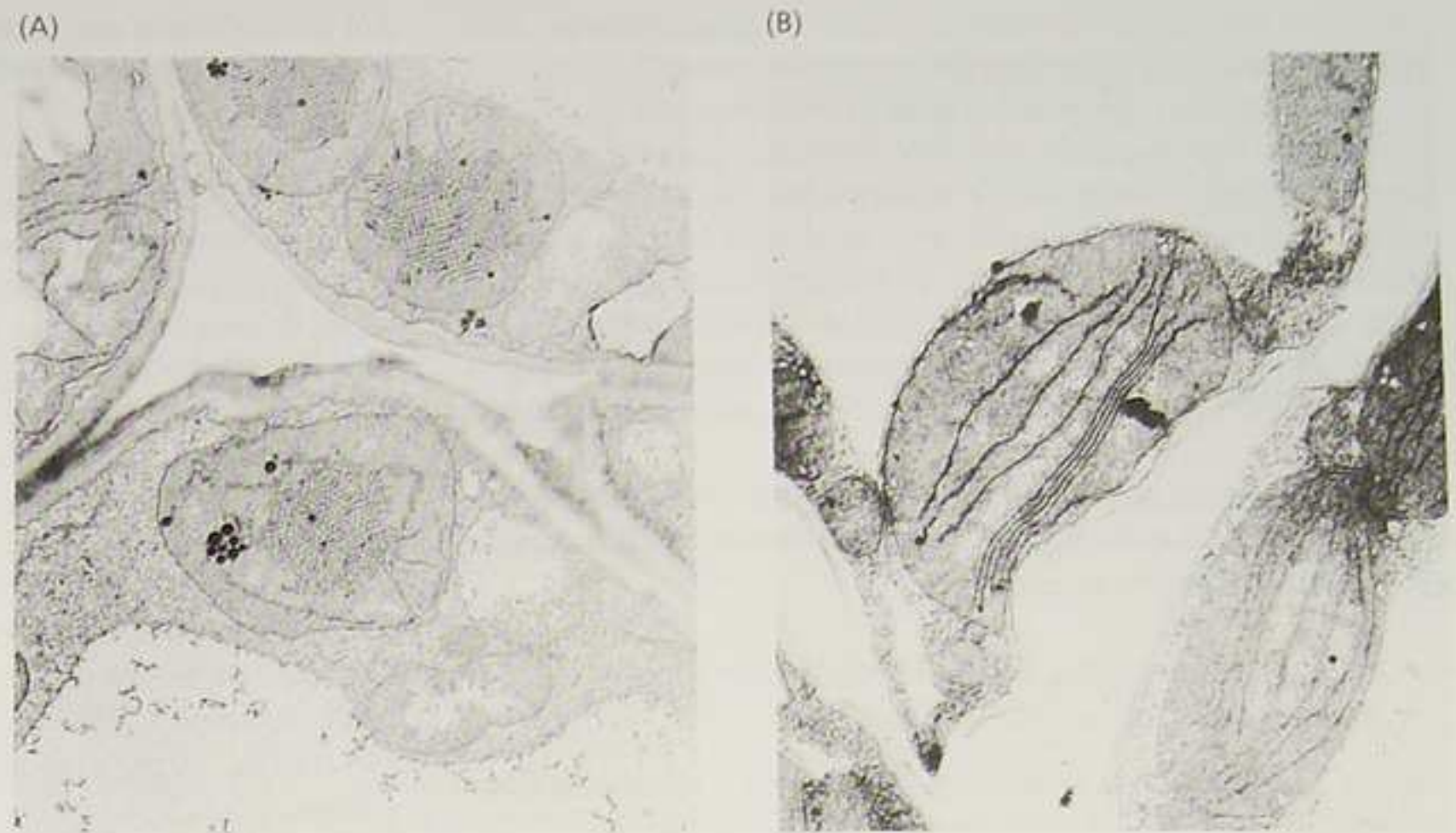



FIGURA 21.19 Efeito da citocinina no movimento de aminoácidos em plântulas de pepino. Utilizou-se um aminoácido não-metabolizável marcado radioativamente, como o ácido aminoisobutírico, aplicado em um pequeno ponto no cotilédone direito de cada uma das plântulas (retirado de dados obtidos por K. Mothes).

(A) (B)

FIGURA 21.20 A citocinina influencia o desenvolvimento de plântulas tipo selvagem de *Arabidopsis* que crescem no escuro. (A) Os plastídeos desenvolvem-se como estioplastos na planta-controle que cresce no escuro. (B) O tratamento com citocinina resultou na formação dos tilacóides nos plastídeos de plântulas que crescem no escuro (Chory e cols., 1994, cedida por J. Chory, © American Sociaty of Plant Biologists, reproduzida com permissão).

o alongamento do hipocótilo nas concentrações que promovem a expansão de folhas e de cotilédones de plântulas crescidas no escuro.

Em experimentos relacionados, o alongamento do entrenó e da raiz é inibido em plantas transgênicas que expressam o gene *ipt* e em mutantes com superprodução de citocinina. É provável que a inibição do alongamento do hipocótilo e do entrenó causada pelo excesso de citocinina deva-se à produção do etileno. Essa inibição pode representar um outro exemplo de interdependência das vias reguladas por hormônios (Cary e cols., 1995; Vogel e cols., 1998).

Por outro lado, outros experimentos sugerem que as citocininas endógenas, em concentrações fisiológicas normais, inibem o crescimento da raiz. Por exemplo, tanto um mutante com alelo deficiente para um receptor de citocinina quanto um mutante com um alelo com perda de função para um elemento sinalizador de citocinina apresentam raízes mais longas do que o tipo selvagem (Inoue e cols., 2001; Sakai e cols., 2001). Como visto anteriormente, a planta transgênica de tabaco que superexpressa a citocinina oxidase (e assim reduz os níveis de citocinina) também apresentam raízes mais longas do que o seu tipo selvagem (ver Figura 21.10) (Werner e cols., 2001). Tais resultados indicam que as citocininas endógenas podem regular negativamente o alongamento da raiz.

T_0

Escuro

Luz

Controle T_3

Controle T_3

T_3 + zeatina

T_3 + zeatina

FIGURA 21.21 Efeito da citocinina na expansão de cotilédones de rabanete. O experimento descrito aqui mostra que os efeitos da luz e da citocinina são aditivos. T_0 representa a germinação das plântulas de rabanete antes de iniciar o experimento. O cotilédone excisado foi incubado por três dias (T_3) na luz ou no escuro, com ou sem 2,5mM de zeatina. Em ambas as condições de luz e escuro, os cotilédones tratados com zeatina expandiram mais do que no controle (Huff e Ross, 1975).

Os processos que estão sob regulação da citocinina são demonstrados nas plantas que superproduzem o hormônio

O gene *ipt* do plasmídeo Ti da *Agrobacterium* tem sido introduzido em muitas espécies vegetais, resultando na superprodução de citocinina. Essas plantas transgênicas exibem uma forma anormal de desenvolvimento, o que sugere o papel biológico das citocininas.

Conforme já discutido, os tecidos vegetais transformados pela *Agrobacterium*, carregando um tipo selvagem do plasmídeo Ti, produzem tumores devido à superprodução de auxina e citocinina. Como mencionado inicialmente, se todos os demais genes do T-DNA forem retirados e o tecido vegetal transformado com o T-DNA contendo somente um gene marcador seletivo de resistência a antibiótico e o gene *ipt*, ocorrerá a proliferação de brotos em vez de calos.

Os brotos formados como teratomas pela transformação dos tecidos com o gene *ipt* são difíceis de enraizar e, quando ocorre a formação de raízes, eles tendem a ter o crescimento atrofiado. Como resultado, é difícil de se obter plantas a partir de brotos que ex-

pressam o gene *ipt* sob o controle de seu próprio promotor, pois este é constitutivo e o gene continuamente expresso.

Para superar o problema, vários promotores, nos quais a expressão pode ser regulada, têm sido utilizados para dirigir a expressão do gene *ipt* nos tecidos transformados. Por exemplo, vários estudos têm empregado um promotor de choque térmico, o qual é induzido em resposta à elevação da temperatura, para induzir a expressão do gene *ipt* em tabaco e em *Arabidopsis* transgênicos. Nessas plantas, a indução pelo calor aumenta substancialmente o nível de zeatina, zeatina ribosídeo e ribotídeo, além do conjugado *N*-zeatina.

Essas plantas com superprodução de citocinina exibem várias características que indicam o papel da citocinina na fisiologia e no desenvolvimento vegetal.

- Os meristemas apicais das partes aéreas que superproduzem citocinina apresentam mais folhas.
- As folhas possuem altos níveis de clorofila e são muito mais verdes.
- As partes aéreas adventícias podem ser formadas a partir das nervuras foliares e pecíolos não lesionados.
- A senescência foliar é retardada.
- A dominância apical é muito reduzida.
- As plantas com superprodução de citocinina são atrofiadas, com entrenós muito curtos.
- O enraizamento de estacas caulinares é reduzido, assim como a taxa de crescimento da raiz.

Algumas das conseqüências da superprodução de citocinina poderiam beneficiar muito a agricultura, se fosse possível controlar a síntese desse hormônio. Devido à possibilidade de retardar a senescência foliar nos vegetais que superproduzem citocinina, poderia ser possível estender a produtividade fotossintética (esse aspecto será discutido rapidamente).

Além disso, a produção de citocinina poderia estar associada a danos causados por predadores. Por exemplo, plantas de tabaco transformadas com o gene *ipt*, sob o controle do promotor de um gene inibidor de protease II que é induzido por ferimento, apresentaram maior resistência aos danos causados por insetos. Larvas de insetos da família *Sphingidae* consumiram até 70% menos folhas de tabaco, em plantas que expressavam o gene *ipt* controlado pelo promotor do gene inibidor de protease (Smigocki e cols., 1993).

MODOS DE AÇÃO CELULAR E MOLECULAR DA CITOCININA

A diversidade dos efeitos da citocinina no crescimento e no desenvolvimento vegetal é compatível com o envolvimento de rotas de transdução de sinal com ramificações que levam a respostas específicas. Embora o nosso conhecimento do modo de ação da citocinina em níveis celular e molecular seja ainda fragmentado, tem-se obtido significativos progressos. Nesta seção, serão tratados a natureza do receptor de citocinina e os vários genes regulados por esse hormônio, bem como o modelo de sinalização da citocinina baseado nas informações atualmente disponíveis.

Foi identificado um receptor de citocinina semelhante ao sistema de receptores de dois componentes de bactéria

O primeiro indício da natureza do receptor de citocinina vem da descoberta do gene *CKI1*. O gene *CKI1* foi identificado na seleção de genes que, quando superexpressados, conferiam crescimento de culturas de células de *Arabidopsis*, independentemente da presença de citocinina. Como já discutido, as células vegetais em cultura necessitam, em geral, de citocinina para a divisão. Entretanto, as linhagens celulares que superexpressam o *CKI1* são capazes de crescer em cultura sem a adição de citocinina.

O *CKI1* codifica uma proteína com seqüência semelhante ao sistema sensor histidina quinase de dois componentes de bactéria, os quais são receptores ubíquos em procariontes (ver **Capítulos 14 e 17 na Internet**). O sistema regulador de dois componentes de bactéria é mediador de várias respostas ao estímulo ambiental, tais como a osmorregulação e a quimiotaxia. Tais sistemas tipicamente são compostos por dois elementos funcionais: um *sensor histidina quinase*, ao qual se liga um sinal, e um *regulador de resposta downstream*, cuja atividade é regulada via fosforilação do sensor histidina quinase. O sensor histidina quinase é em geral uma proteína ligada à membrana, que contém dois domínios distintos chamados de domínio *input* e domínio histidina quinase ou "transmissor" (Figura 21.22).

A detecção de um sinal pelo domínio *input* altera a atividade do domínio histidina quinase. Os sensores quinase ativos são dímeros que transfosforilam um resíduo conservado de histidina. Este fosfato é, então, transferido para um resíduo conservado de aspartato no domínio receptor de um regulador de resposta análogo (ver Figura 21.22) e essa fosforilação altera a atividade das quinases. A maioria dos reguladores de respostas também possui domínios *output*, que agem como fatores de transcrição.

O fenótipo resultante da superexpressão do *CKI1*, combinado à sua analogia com receptores de bactéria, sugere que o *CKI1* e/ou a histidina quinases são receptores de citocinina. A fundamentação para este modelo vem da identificação do gene *CRE1* (Inoue e cols., 2001).

Assim como o *CKI1*, o *CRE1* codifica uma proteína semelhante à histidina quinase bacteriana. O mutante com perda de função *cre1* foi identificado em uma seleção genética de mutantes que apresentaram falha no desenvolvimento de partes aéreas, a partir de células cultivadas na presença de citocinina. Essa seleção é essencialmente oposta à já descrita, na qual o gene *CKI1* foi identificado no mutante pelo ganho de função (a capacidade de se dividir na ausência de citocinina). Os mutantes *cre1* são também resistentes à inibição do alongamento da raiz causada pela citocinina.

As evidências de que o *CRE1* codifica o receptor de citocinina vêm da análise da expressão da proteína em levedura. As células das leveduras também possuem um sensor histidina quinase, e a remoção do gene que codifica esta quinase — *SLN1* — é letal. A expressão do *CRE1* na levedura *SLN1*-deficiente, pode restaurar a viabilidade, *mas somente se as citocininas estiverem presentes no meio*. Assim, a atividade do CRE1 (i. é, sua capacidade de substituir o SLN1) é dependente de citocinina, a qual, associada com o fenótipo citocinina-insensível do mutante *cre1* de *Arabidopsis*, demonstra inequivocamente que o CRE1 é um receptor de citocinina, embora ainda continue indeterminado se o CKI1 também é um receptor de citocinina.

Dois outros genes do genoma de *Arabidopsis* (*AHK2* e *AHK3*) estão proximamente relacionados ao *CRE1*, sugerindo que, seme-

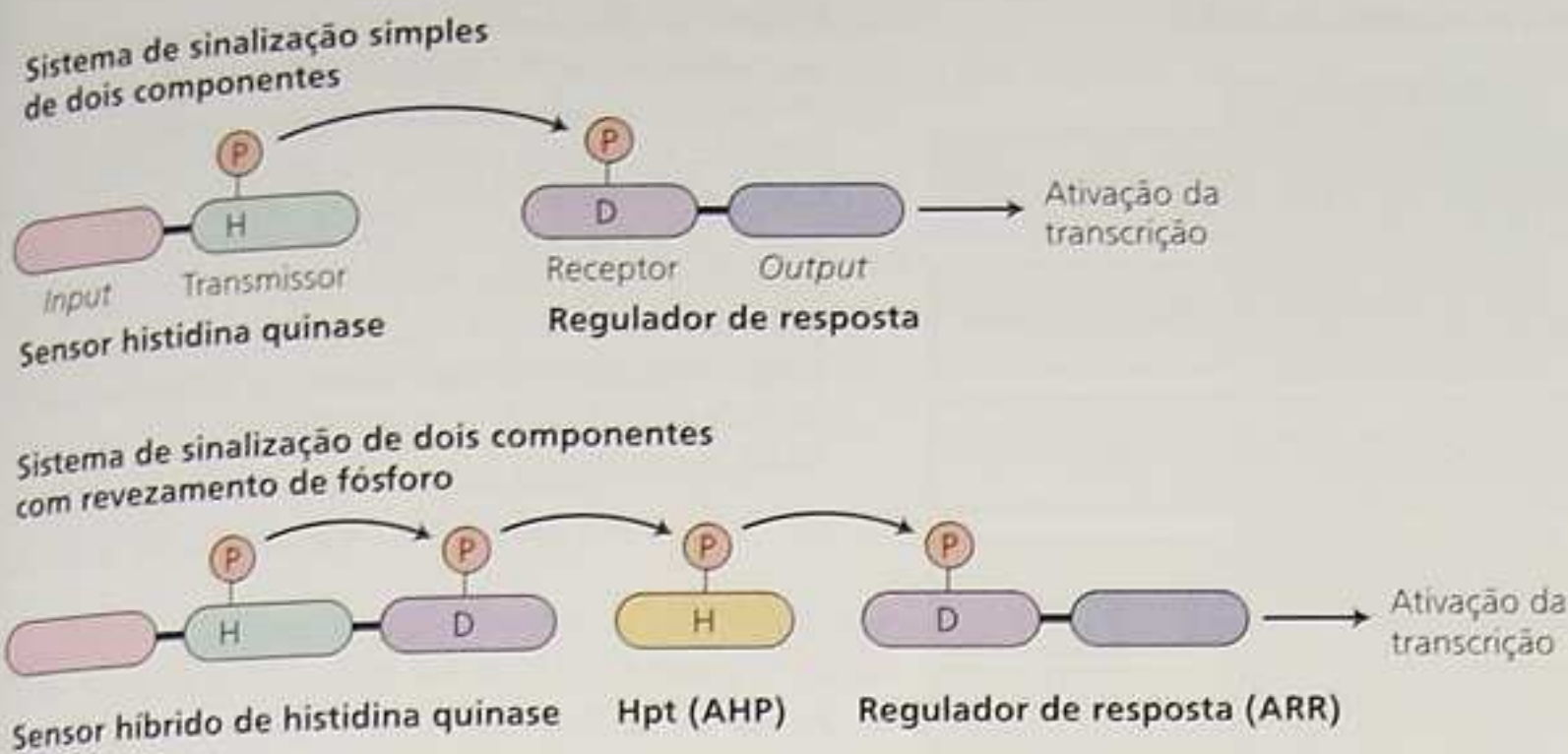



FIGURA 21.22 O tipo simples *versus* o tipo de sistema de sinalização de dois componentes com revezamento de fósforo. (A) No sistema simples de dois componentes, o domínio *input* é o local onde o sinal é percebido, o qual regula a atividade do domínio da histidina quinase, e, quando ativado, autofosforila um resíduo conservado de His. O fosfato é, então, transferido para o resíduo Asp, que está localizado no domínio receptor de um regulador de resposta. A fosforilação desta Asp regula a atividade do domínio *output* do regulador de resposta, o qual, em muitos casos, é um fator de transcrição. (B) No tipo de sistema de sinalização de dois componentes com revezamento de fósforo, uma posição extra de transferência de fósforo é mediada por uma proteína histidina de transferência de fósforo (Hpt), chamada de AHP em *Arabidopsis*. Os reguladores de resposta em *Arabidopsis* são chamados de ARRs (do inglês, *Arabidopsis response regulators*). H = histidina, D = aspartato.

lhante aos receptores de etileno (ver Capítulo 22), os receptores de citocinina são codificados por uma família de multigenes. Na verdade, tem sido demonstrado que as citocininas ligam-se com alta afinidade ao domínio extracelular do CRE1, AHK2 e AHK3, confirmando que eles são de fato, receptores de citocininas (Yamada e cols., 2001), o que aumenta a possibilidade de que tais genes sejam, pelo menos em parte, geneticamente redundantes (como são os receptores de etileno), o que pode explicar os fenótipos relativamente moderados que resultam da perda de função do mutante *cre1*.

As citocininas causam um aumento rápido na expressão dos genes reguladores de resposta

Um dos efeitos primários da citocinina é alterar a expressão de vários genes. O primeiro conjunto de genes ativado em resposta à citocinina é o dos genes *ARR* (reguladores de respostas da *Arabidopsis*). Eles são homólogos ao domínio receptor dos reguladores de resposta de dois componentes de bactéria, o alvo *downstream* do sensor histidina quinase (ver a seção anterior).

Os reguladores de resposta em *Arabidopsis* são codificados por uma família multigênica e pertencem a duas classes: genes ***ARR* tipo-A**, formados unicamente de domínios receptores, e genes ***ARR* tipo-B**, que possuem um domínio de fator de transcrição, além do domínio receptor (Figura 21.23). A taxa de transcrição do gene tipo-A é aumentada dentro de 10 minutos em resposta à aplicação de citocinina (Figura 21.24) (D´Agostino e cols., 2000). Essa rápida indução é específica para citocinina e não necessita de uma nova

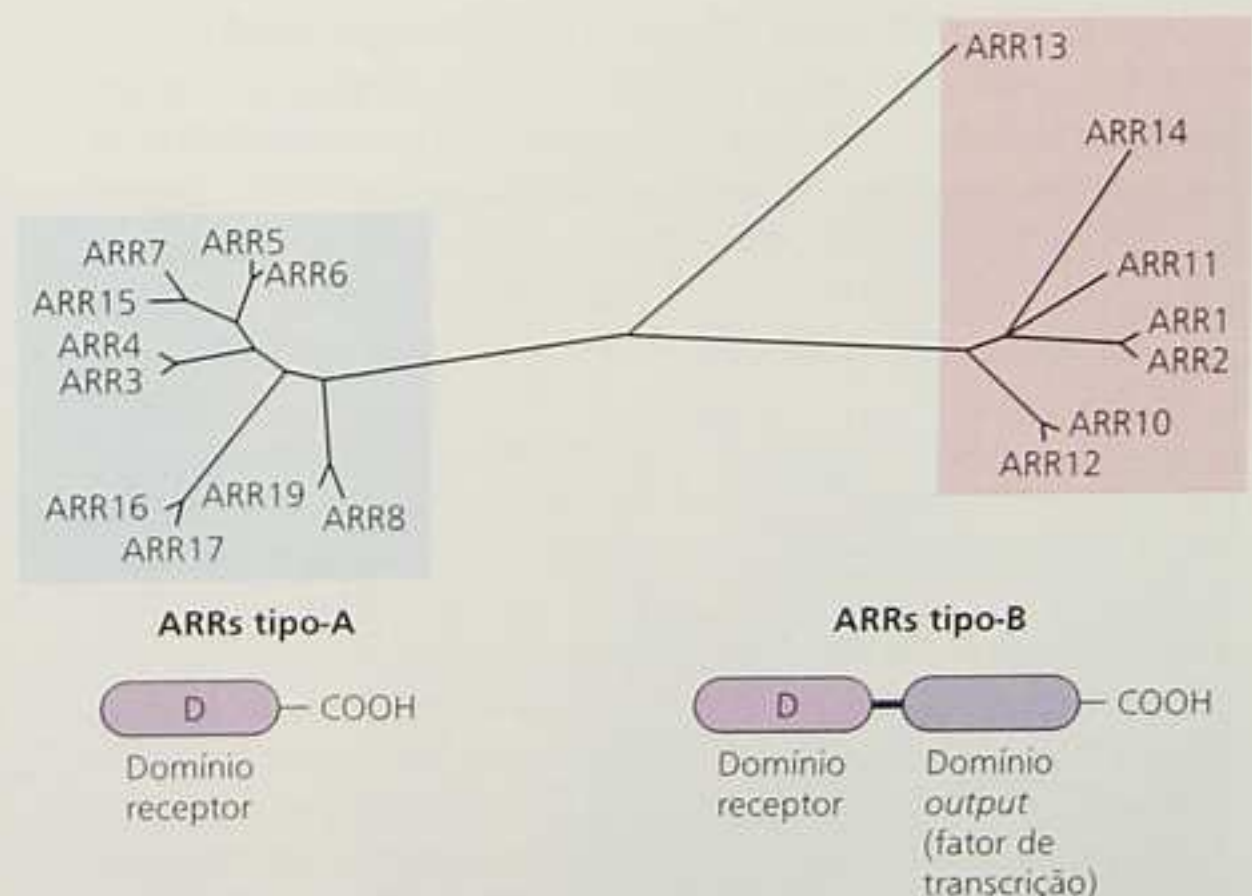



FIGURA 21.23 Árvore filogenética dos reguladores de resposta de *Arabidopsis*. A parte superior da figura mostra a árvore filogenética que representa o grau de parentesco dos domínios receptores presentes no genoma de *Arabidopsis*. As duas proteínas mais próximas na árvore possuem as seqüências mais semelhantes de aminoácidos. Observe que essas duas proteínas pertencem a dois grupos distintos, ou clados, chamados de ARRs tipo-A (azul) e os ARRs tipo-B (vermelho). Tais diferenças nas seqüências estão também refletidas na estrutura de distintos domínios, como representadas na parte inferior da árvore. Os ARRs tipo-A consistem somente de um domínio receptor, mas as proteínas do tipo-A possuem também um domínio *output* unido ao grupo carboxiterminal.

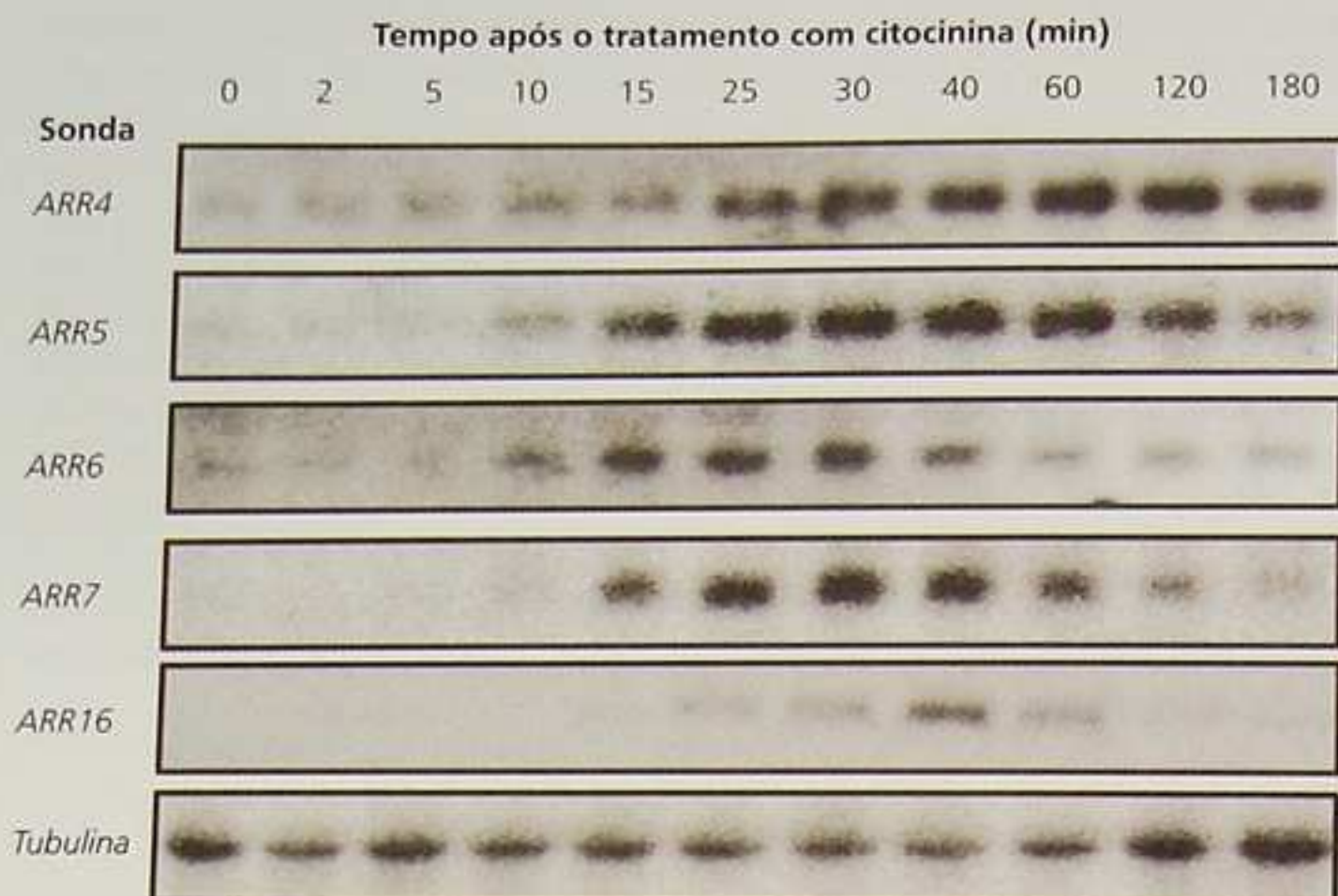



FIGURA 21.24 Indução dos genes *ARR* tipo-A em resposta à citocinina. O RNA de plântulas de *Arabidopsis*, tratadas com citocinina pelo tempo indicado, foi isolado e analisado por *Northern blotting*. Cada linha mostra o resultado da hibridização da sonda do *Northern blotting* com um gene tipo-A individual, cada coluna apresentando o RNA obtido de plântulas de *Arabidopsis* tratadas com citocinina, pelo tempo indicado. A banda mais escura indica o maior nível de mRNA de *ARR* na amostra (D' Agostino e cols. 2000).

síntese protéica. Tais aspectos são legítimos indicadores de genes de resposta primária (discutido nos Capítulos 17 e 19).

A rápida indução dos genes tipo-A, associada à sua similaridade com os elementos de sinalização, que se supõe terem ação *downstream* do sensor da histidina quinase, sugere que tais elementos agem *downstream* da família de receptores de citocinina CRE1 para mediar a resposta primária da citocinina. Curiosamente, um desses genes tipo-A, *ARR5*, é expresso principalmente no meristema apical de raízes e partes aéreas (Figura 21.25), papel coerente com a regulação da proliferação celular, um aspecto-chave da ação da citocinina.

A expressão de vários outros genes é alterada em resposta à citocinina, mas em geral com cinética mais lenta do que os genes do tipo-A. Esta inclui o gene que codifica a nitrato redutase, genes

(A) (B) (C)

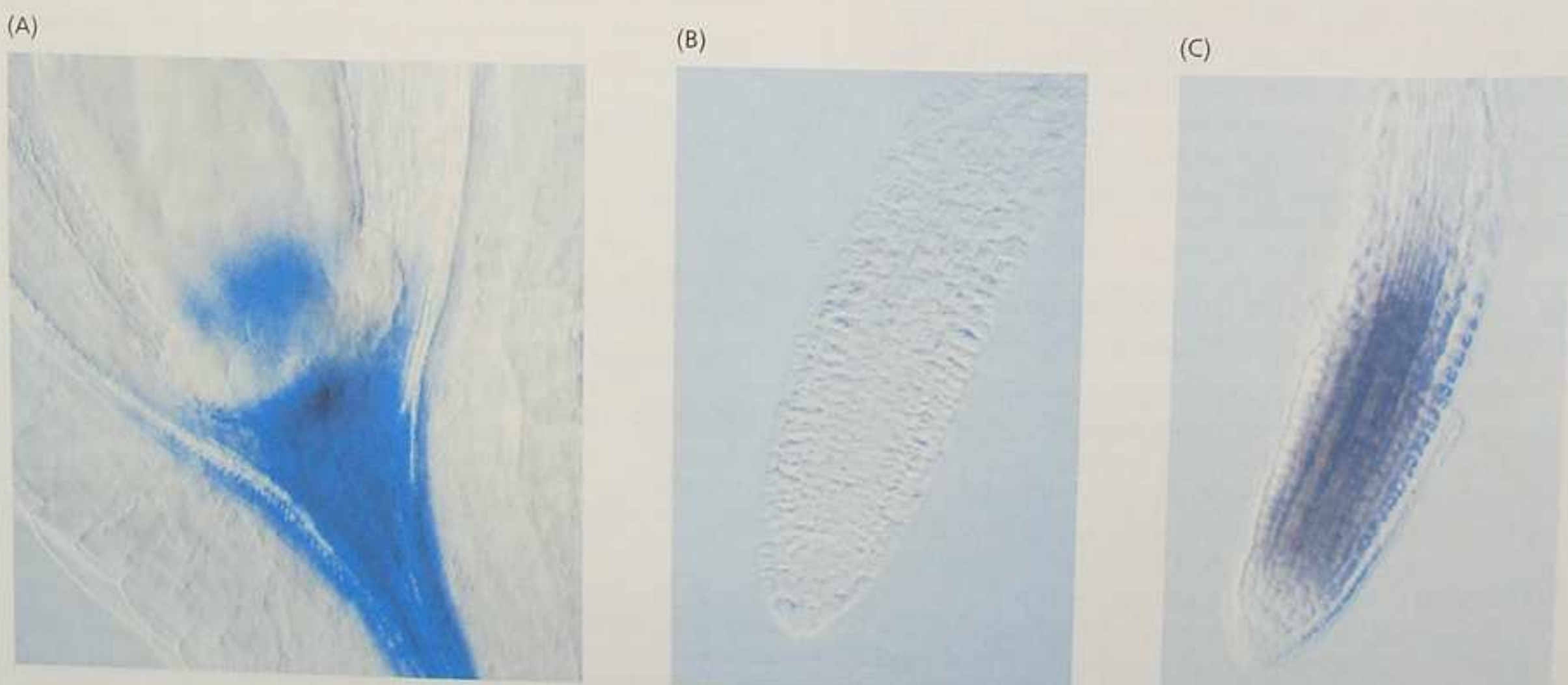



FIGURA 21.25 Expressão do *ARR5*. O padrão de expressão do *ARR5* foi examinado pela ligação do promotor com o gene repórter *GUS* (A) ou pela hibridização *in situ* (B e C). Neste último, o tecido é hibridizado com um filamento de RNA *ARR5* marcado em uma orientação-senso (B) ou anti-senso (C). O RNA senso é o controle negativo, revelando o segundo plano sem coloração específica. A sonda anti-senso hibridiza especificamente com o mRNA *ARR5* presente no tecido, revelando, assim, sua distribuição espacial. Em ambos os métodos, a expressão do *ARR5* é principalmente observada no meristema apical (D' Agostino e cols., 2000).

regulados pela luz, como *LHCB* e *SSU*, além de genes relacionados com defesa, como *PR1*, além de genes que codificam uma extensina (proteína da parede celular rica em hidroxiprolina), RNAs ribossomais, citocromos P450 e peroxidase. A citocinina eleva a expressão desses genes, tanto aumentando a taxa de transcrição (como no caso dos *ARR*s tipo-A) quanto pela estabilização do RNA transcrito (o gene da β-extensina, por exemplo).

A histidina fosfotransferase pode mediar a cascata de sinalização da citocicina

Na discussão anterior, viu-se que a citocinina liga-se ao receptor CRE1 para iniciar a resposta que culmina com o aumento da transcrição dos *ARR*s tipo-A. As proteínas ARR tipo-A, por sua vez, podem regular a expressão de vários outros genes, bem como a atividade de várias proteínas-alvo que alteram a função celular. Como o sinal é propagado do CRE1 (o qual está na membrana plasmática) para o núcleo, a fim de alterar a transcrição do *ARR* tipo-A ?

Um conjunto de genes que provavelmente está envolvido nessa cascata de sinalização codifica a proteína **AHP** (*h*istidina *f*osfotransferase de *Arabidopsis*). Nos sistemas de dois componentes, que envolvem um sensor quinase ligado a um domínio receptor (estrutura de muitos sensores-histidina quinases de eucariontes, incluindo aqueles da família CRE1), existe um conjunto adicional de fosfotransferases mediadas por uma **proteína histidina de transferência de fósforo (Hpt)**.

O fosfato é inicialmente transferido do ATP para uma histidina no domínio histidina quinase e, daí, transferido para um resíduo aspartato ligado ao receptor. A partir do resíduo aspartato, o grupo fosfato é transferido para uma histidina da proteína Hpt e, finalmente, para um aspartato do domínio receptor do regulador de resposta (ver Figura 21.22). Essa fosforilação do domínio receptor do regulador de resposta altera a sua atividade. Assim, supõe-se que as proteínas Hpt sejam mediadoras da transferência do fosfato entre os sensores quinases e os reguladores de resposta.

Existem cinco genes Hpt em *Arabidopsis*, chamados de *AHP*s. As proteínas AHP têm apresentado uma associação física com os domínios receptores em várias histidinas quinases de *Arabidopsis*, incluindo CRE1 e um subgrupo de AHPs que desloca-se, conforme mostrado, transitoriamente do citoplasma para o núcleo em resposta à citocinina (Figura 21.26) (Hwang e Sheen, 2001). Tal descoberta sugere que as AHPs são alvos *downstream* imediatos da ativação do receptor CRE e que essas proteínas realizam a transdução do sinal da citocinina para o núcleo.

A indução da fosforilação pela citocinina ativa fatores de transcrição

A questão que surge é: como a ativação das AHPs, uma vez no núcleo, age para regular a transcrição de genes? Estudos genéticos em plantas intactas de *Arabidopsis* e de superexpressão em protoplastos isolados de *Arabidopsis*, usando um gene-repórter que responde a uma citocinina, têm fornecido prováveis respostas (Hwang e Sheen, 2001; Sakai e cols., 2001).

–Zeatina | +Zeatina, 0,5 h | +Zeatina, 1,5 h

AHP1-GFP

AHP2-GFP

AHP5-GFP

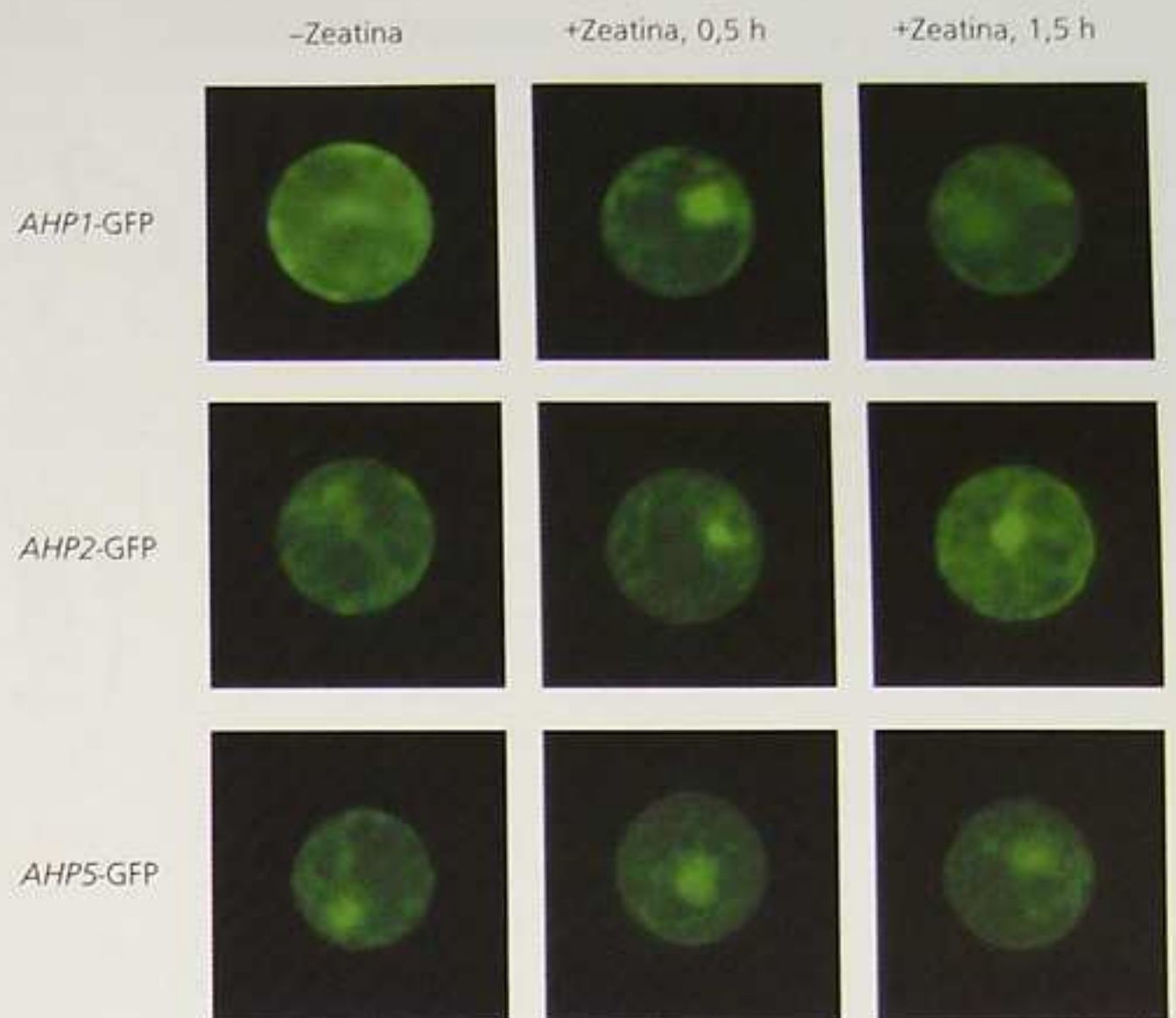



FIGURA 21.26 A citocinina induz o movimento transitório de algumas proteínas AHP para o interior do núcleo. Os protoplastos de *Arabidopsis*, expressando vários genes *AHP* unidos à proteína verde fluorescente (GFP) como um repórter, foram tratados com zeatina e monitorados por 1,5 hora. *AHP1*-GFP e *AHP2*-GFP exibem localização nuclear após 30 minutos, mas esta localização é transitória no caso do *AHP1*-GFP. A zeatina não parece afetar a distribuição do *AHP5*-GFP (Hwang e Sheen, 2001).

A interrupção do *ARR1*, um dos genes *ARR* tipo-B, reduz a indução dos genes *ARR* tipo-A em resposta à citocinina. Por outro lado, o aumento na função do *ARR1* aumenta a resposta dos genes tipo-A a citocinina, sugerindo que o ARR1, que é um fator de transcrição, regula diretamente a transcrição dos *ARR*s tipo-A e, por analogia, de outros membros da família *ARR* tipo-B (ver Figura 21.23), os quais também possuem a expressão gênica regulada pela citocinina.

Essa conclusão é amparada pela descoberta de que os *ARR*s tipo-B funcionam como ativadores transcricionais e que existem múltiplas regiões de ligação para o ARR1, um ARR tipo-B, na seqüência de regulação 5' do DNA dos genes ARR tipo-A.

Um modelo de sinalização da citocinina é apresentado na Figura 21.27. A citocinina liga-se ao receptor CRE1 e inicia a cascata de fosforilação, que resulta na fosforilação e na ativação de um subgrupo de proteínas ARR tipo-B. A ativação das proteínas tipo-B (fatores de transcrição) leva à ativação da transcrição dos genes tipo-A. As proteínas ARR tipo-A são também fosforiladas em resposta à citocinina e, talvez junto com as proteínas tipo-B, elas interajam com vários alvos, para mediar as alterações nas funções celulares, como a ativação do ciclo celular. Os ARRs tipo-A são também capazes de inibir sua própria expressão por um mecanismo ainda desconhecido, promovendo uma via de retrocontrole negativo (ver Figura 21.27). São necessários muitos outros trabalhos para confirmar e definir este modelo, mas está-se começando a vislumbrar, pela primeira vez, a base molecular da ação da citocinina nos vegetais.

1. A citocinina liga-se ao CRE1, o qual provavelmente ocorre como um dímero. A citocinina se liga a uma porção extracelular do CRE1 chamada de domínio CHASE. Dois outros sensores quinases híbridos (AHK2 e AHK3), contendo um domínio CHASE, agem também provavelmente como receptores de citocinina em *Arabidopsis*.

2. A ligação da citocinina a tais receptores promove a ativação da sua atividade histidina quinase. O fosfato é transferido para um resíduo aspartato (D) ligado ao domínio receptor.

3. O fosfato é, então, transferido para uma histidina conservada, presente em uma proteína AHP.

4. A fosforilação promove o movimento da proteína AHP para o interior do núcleo, onde o fosfato é transferido para um resíduo aspartato localizado no domínio receptor do ARR tipo-B.

5. A fosforilação do ARR tipo-B ativa o domínio *output*, para induzir a transcrição dos genes que codificam os ARRs tipo-A.

6. Os ARRs tipo-A são possivelmente também fosforilados pelas proteínas AHP.

7. Os ARRs tipo-A fosforilados interagem com vários efetores, para mediar mudanças na função celular atribuídas à citocinina (indicado no modelo como "respostas à citocinina").

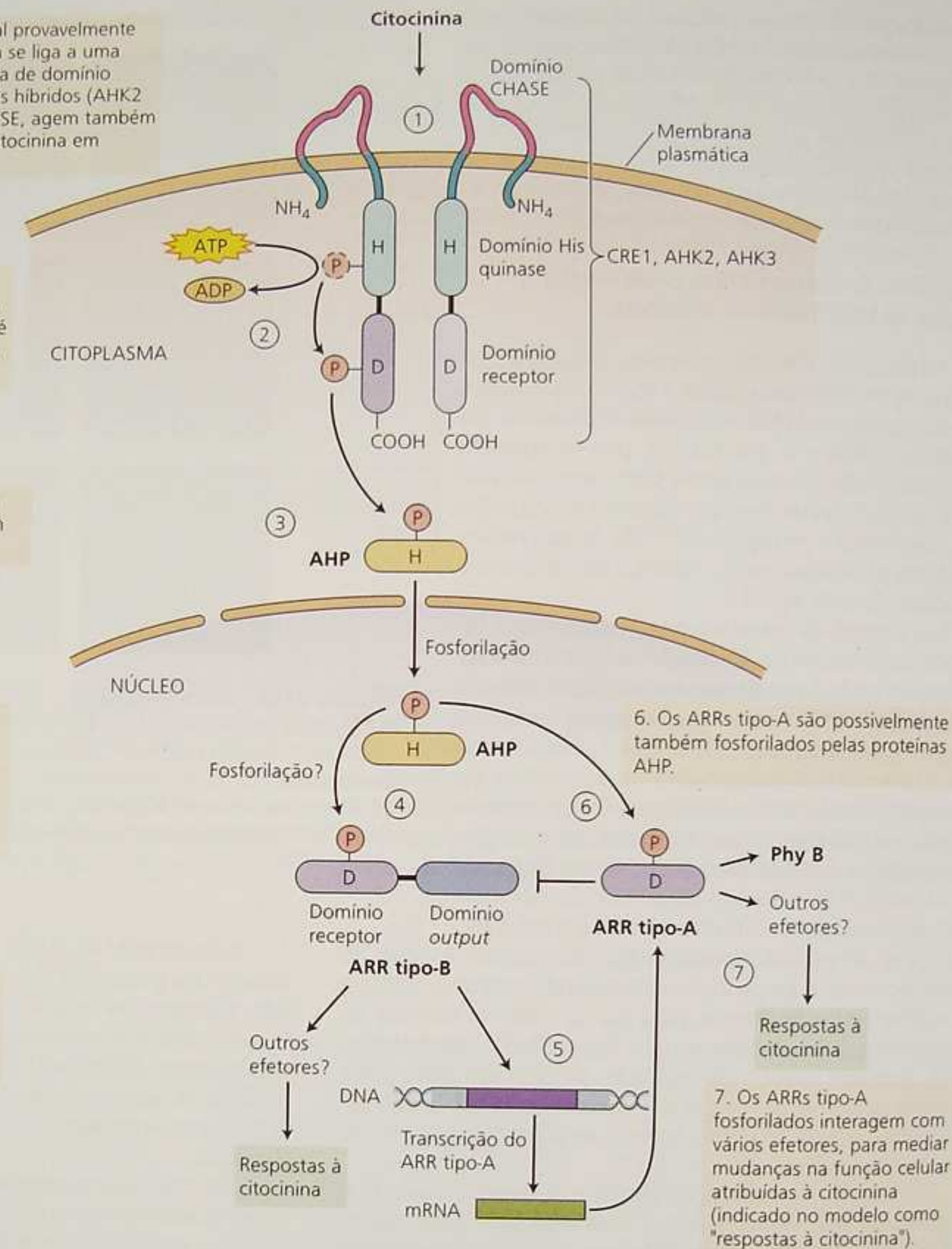



FIGURA 21.27 Modelo de sinalização da citocinina. Em um futuro próximo, poderá ser vislumbrado um refinamento do modelo, visto que atualmente estão disponíveis ferramentas para a análise das interações entre estes elementos.

RESUMO

As células vegetais maduras geralmente não se dividem nas plantas intactas, mas podem ser estimuladas à divisão por lesão, por infecção com certas bactérias e por hormônios vegetais, incluindo as citocininas. As citocininas são aminopurinas com N^6 substituído, que iniciam a proliferação celular em muitas células vegetais, quando cultivadas em meio de cultura que contenha uma auxina. A principal citocinina nos vegetais superiores — zeatina ou *trans*-6-(4-hidróxi-3-metilbut-2-enilamino) purina — também está presente nas plantas como um ribosídeo ou ribotídeo e como glicosídeo. Tais formas são em geral ativas como citocininas em bioensaios, pela sua conversão enzimática à zeatina livre nos tecidos vegetais.

A primeira etapa na síntese da citocinina — a transferência do grupo isopentenil do DMAPP para o nitrogênio 6 da adenosina tri

e difosfato — é catalisada pela isopentenil transferase (IPT). O produto dessa reação é rapidamente convertido à zeatina e outras citocininas. As citocininas são sintetizadas nas raízes, em embriões em desenvolvimento, folhas jovens, frutos e nos tecidos da galha da coroa. As citocininas são também sintetizadas por bactérias, insetos e nematódeos associados às plantas.

A citocinina oxidase degrada a citocinina irreversivelmente e pode desempenhar um papel na regulação dos níveis desse hormônio. A conjugação das cadeias laterais e de parte da molécula de adenosina com açúcares (geralmente glicose) também podem ter um papel na regulação dos níveis de citocinina, atingindo *subpools* desse hormônio com papéis distintos, como o transporte. As citocininas são igualmente interconvertidas entre as formas livre, nucleosídeo e nucleotídeo.

A galha da coroa origina-se a partir dos tecidos vegetais infectados pela *Agrobacterium tumefaciens*. A bactéria injeta uma região específica de seu plasmídeo Ti, chamada de T-DNA, no interior da célula vegetal lesionada, e o T-DNA é incorporado no genoma hospedeiro. O T-DNA possui um gene para síntese de citocinina, bem como genes para a síntese de auxina. Esses fitoncogenes são expressos nas células vegetais, levando à síntese de hormônios e à proliferação desordenada de células, formando a galha.

As citocininas são mais abundantes em células jovens em divisão nos meristemas da parte aérea e do ápice radicular. Elas não parecem ser ativamente transportadas pelos tecidos vivos do vegetal. Ao contrário; são transportadas passivamente a partir das raízes até a parte aérea pelo xilema, junto com a água e os sais minerais. Contudo, pelo menos em ervilha, a parte aérea pode regular o fluxo de citocinina da raiz.

As citocininas participam na regulação de muitos processos do vegetal, incluindo a divisão celular, a morfogênese da parte aérea e das raízes, a maturação de cloroplastos, o alongamento celular e a senescência. Tanto a citocinina quanto a auxina regulam o ciclo celular vegetal e são necessárias para a divisão celular. A função das citocininas tem sido elucidada por intermédio de sua aplicação exógena, pelo fenótipo de plantas transgênicas que superexpressam citocininas, como resultado da introdução do gene *ipt* de bactéria, e recentemente pelas plantas transgênicas que possuem uma redução no nível endógeno de citocinina, como resultado da superexpressão da citocinina oxidase.

Além da divisão celular, a razão entre a auxina e a citocinina determina a diferenciação em raiz ou gema de tecidos vegetais cultivados: altas taxas promovem a formação de raízes e baixas taxas promovem a formação de gemas. As citocininas também estão envolvidas na liberação das gemas axilares da dominância apical. No musgo *Funaria*, as citocininas aumentam notavelmente o número de "gemas", estruturas que darão origem ao estágio de desenvolvimento do gametófito folhoso.

A compreensão do mecanismo de ação da citocinina está apenas iniciando. O receptor de citocinina foi identificado em *Arabidopsis*. Essa proteína transmembrana está relacionada ao sistema sensor histidina quinase de dois componentes de bactéria. As citocininas aumentam a quantidade de vários mRNA. Alguns deles são genes de resposta primária, similares aos reguladores de resposta de dois componentes das bactérias. O mecanismo transdutor de sinais do CRE1 para a ativação da transcrição dos *ARRs* tipo-A envolve outros elementos homólogos de dois componentes.

Material da Internet

Tópicos da Internet

21.1 Células cultivadas podem adquirir a capacidade de sintetizar citocininas
É descrito o fenômeno da habituação, por meio do qual calos tornam-se independentes de citocinina.

21.2 Estrutura de algumas citocininas que ocorrem naturalmente
São apresentadas as estruturas de várias citocininas que ocorrem naturalmente.

21.3 Vários métodos são utilizados para detectar e identificar as citocininas
As citocininas podem ser qualificadas usando-se métodos sensíveis imunológicos e físicos.

21.4 As citocininas estão também presentes em alguns tRNA dos animais e plantas
Adenosinas modificadas, perto da extremidade 3' do anticódon de alguns tRNA, possuem atividade de citocinina.

21.5 O plasmídeo Ti e plantas geneticamente modificadas
São descritos os usos do plasmídeo Ti da *Agrobacterium* na bioengenharia.

21.6 Árvore filogenética dos genes *IPT*
Arabidopsis possui nove diferentes genes *IPT*, vários dos quais formam um clado distinto com seqüências de outros vegetais.

21.7 A citocinina pode promover o desenvolvimento mediado pela luz
As citocininas podem mimetizar o efeito da mutação *det* no desenvolvimento do cloroplasto e reverter o estiolamento.

Ensaio da Internet

21.1 A citocinina induz a forma e a estrutura em musgos
São descritos os efeitos das citocininas no desenvolvimento do protonema de musgos.

Referências bibliográficas

Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W., and Gordon, M. P (1984) T-DNA of Agrobacterium *tumefaciens encodes* an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5994-5998.

Akiyoshi, D. E., Morris, R. O., Hinz, R., Mischke, B. S., Kosuge, T., Garfinkel, D. J., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1983) Cytokinin/auxin balance in crown gall tumors is regulated by specific loci in the T-DNA. *Proc. Nall. Acad. Sci. USA* 80: 407-111.

Akiyoshi, D. E., Regier, D. A., and Gordon, M. P (1987) Cytokinin production by Agrobacterium and *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.* 169: 4242-4248.

Aloni, R., Wolf, A., Feigenbaum, P. Avni, A., and Klee, H. J. (1998) The Never ripe mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls in tomato stems. *Plant Physiol.* 117: 841-849.

Barry, G. F., Rogers, R. G., Fraley, R. T., and Brand, L. (1984) Identification of cloned biosynthesis gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4776-1780.

Beveridge, C. A., Murfet, I. C., Kerhoas, L., Sotta, B., Miginiac, E., and Rameau, C. (1997) The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant rms4. *Plant J.* 11: 339-345.

Bomhoff, G., Klapwijk, P M., Kester, H. C. M., and Schilperoort, R. A. (1976) Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by plasmid of *Agrobacterium tumefaciens. Mol. Gen. Genet.* 145: 177-181.

Braun, A. C. (1958) A physiological basis for autonomous growth of the crown-gall tumor cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:344-349.

Brzobohaty, B., Moore, I., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., and Palme, K. (1993) Release of active cytokinin by a Pglucosidase localized to the maize root meristem. *Science* 262: 1051-1054.

Caplin, S. M., and Steward, F C. (1948) Effect of coconut milk on the growth of the explants from carrot root. *Science* 108: 655-657.

Cary, A. J., Liu, W., and Howell, S. H. (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Physiol.* 107: 1075-1082.

Chilton, M.-D. (1983) A vector for introducing new genes into plants. *Sci. Am.* 248(00): 50-59.

Chilton, M.-D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P, and Nester, E. W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263-271.

Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., and Brenner, M. (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in Arabidopsis. Det mutants have an altered response to cytokinins. *Plant Physiol.* 104: 339-347.

D'Agostino,1. B., Deruere, J., and Kieber, J. J. (2000) Characterization of the response of the Arab'opsis ARR gene family to cytokinin. *Plant Physiol.* 124: 1706-1717.

Elzen, G. W. (1983) Cytokinins and insect galls. *Comp. Biochem. Physiol.* 76A(1):17-19.

Estruch, J. J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J., and Spena, A. (1991) The plant oncogene RolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J.* 10: 2889-2895.

Faiss, M., Zalubiova, J., Stmad, M., and Schmllling, T. (1997) Conditional transgenic expression of the ipt gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *Plant J.* 12: 410-415.

Gan, S., and Amasino, R. M. (1995) Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* 270: 1986-1988.

Garfinkel, D. J., Simpson, R. B., Ream, L. W., White, F. E, Gordon, M. P, and Nester, E. W. (1981) Genetic analysis of crown gall: Fine structure map of the T-DNA by site-directed mutagenesis. *Cell* 27:143-153.

Hamilton, J. L., and Lowe, R. H. (1972) False broomrape: A physiological disorder caused by growth-regulator imbalance. *Plant Physiol.* 50:303-304.

Houba-Herin, N., Pethe, C., d'Alayer, J., and Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from Zea mays: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* 17: 615-626.

Huff, A. K., and Ross, C. W. (1975) Promotion of radish cotyledon enlargement and reducing sugar content by zeatin and red light. *Plant Physiol.* 56: 429-433.

Hwang, I., and Sheen, J. (2001). Two-component circuitry in Arabidopsis signal transducfion. *Nature* 413: 383-389.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y, Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from Arabidopsis. *Nature* 409: 1060-1063.

Itai, C., and Vaadia, Y. (1971) Cytokinin activity in water-stressed shoots. *Plant Physiol.* 47: 87-90.

John, P. C. L., Zhang, K., Don, C., Diederich, L., and Wightman, F. (1993) P34-cdc2 related proteins in control of cell cycle progression, the switch between division and differentiation in tissue development, and stimulation of division by auxin and cytokinin. *Aust. J. Plant Physiol.* 20: 503-526.

Kakimoto, T. (2001) Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell. Physiol.* 42: 677-685.

Letham, D. S. (1973) Cytokinins from *Zea mays. Phytochemistry* 12: 244,5-2455.

Letham, D. S. (1974) Regulators of cell division in plant tissues XX. The cytokinins of coconut milk. *Physiol. Plant.* 32: 66-70.

Martin R. C., Mok M. C., and Mok D. W. S. (1999) Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase in *Phaseolus lunatus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 284-289.

Miller, C. O., Skoog, F., Von Saltza, M. H., and Strong, F. (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 77:1392-1393.

Morris, R. O. (1986) Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in phytopathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 509-538.

Morris, R., Bilyeu, K., Laskey, J., and Cheikh, N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 225: 328-333.

Nooden, L. D., and Letham, D. S. (1993) Cytokinin metabolism and signaling in the soybean plant. *Aust. J. Plant Physiol.* 20:639-653.

Nooden, L. D., Singh, S., and Letham, D. S. (1990) Correlation of xylem sap cytokinin levels with monocarpic senescence in soybean. *Plant Physiol.* 93: 33-39.

Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacqmard, A., and Murray, J. A. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541-1544.

Rupp, H.-M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M., and Schmulling, T. (1999) Increased steady state mRNA levels of the STM and KNATI homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* 18: 557-563.

Sakai, H., Honma, T., Aoyama, T., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Oka, A. (2001) *Arabidopsis ARR1* is a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins. *Science.* 294: 1519-1521.

Samuelson, M. E., Eliasson, L., Larson, C. M. (1992) Nitrate-regulated growth and cytokinin responses in seminal roots of barley. *Plant Physiol.* 98: 309-315.

Skoog, F, and Miller, C. O. (1965) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro.* In *Molecular and Cellular Aspects of Development,* E. Bell, ed., Harper and Row, New York, pp. 481-194.

Smigocki, A., Neal, J. W., Jr., McCanna, I., and Douglass, L. (1993) Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Mol. Biol.* 23: 325-335.

Smith, H. H. (1988) The inheritance of genetic tumors in *Nicotiana* hybrids. *J. Hered.* 79: 277-284.

Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H., and Murray, J. A. H. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* 7: 85-103.

Takei, K., Sakakibara, H., and Sugiyama, T. (2001) Identification of genes encoding adenylate isopentyltransferase, a cytokinin biosynthetic enzyme, in *Arabidopsis thaliana. J. Biol. Chem.* 276: 26405-26410.

Takei, K., Sakakibara, H., Taniguchi, M., and Sugiyama, T. (2001) Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in roots and the translocation to leaf: Implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. *Plant Cell Physiol.* 42:85-93.

Vogel, J. P, Woeste, K., Theologis, A., and Kieber, J. J. (1998) Recessive and dominant mutation in the ethylene biosynthetic gene AC55 of *Arabidopsis* confer cytokinin-insensitivity and ethylene overproduction respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 4766-1771.

Werner, T., Motyka, V, Stmad, M., and Schmulling, T. (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487-10492.

White, P R. (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9: 585-600.

Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., and Mizuno, T. (2001). The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant Cell Physiol.* 42: 1017-1023.

Zhang, K., Letham, D. S., and John, P C. L. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like HI histone kinase. *Planta* 200:2-12.

Capítulo

22 Etileno: o hormônio gasoso

DURANTE O SÉCULO XIX, quando o gás produzido pelo carvão era utilizado para a iluminação das ruas, foi observado que as árvores próximas às lâmpadas perdiam suas folhas de forma mais acentuada que as demais. Posteriormente, evidenciou-se que o gás do carvão e os poluentes atmosféricos afetavam o crescimento e o desenvolvimento vegetais, tendo o etileno sido identificado como um componente ativo do gás de carvão.

Em 1901, Dimitry Neljubov, aluno de pós-graduação do Botanical Institute of St. Petersburg, na Rússia, observou que plântulas de ervilha crescidas no escuro, em laboratório, apresentavam sintomas que mais tarde foram denominados *resposta tríplice*: redução no alongamento do caule, aumento do crescimento lateral (intumescimento) e crescimento horizontal anormal. Quando as plantas eram cultivadas ao ar livre, elas recuperavam a morfologia e a taxa de crescimento normais. Neljubov identificou o etileno, presente no gás do carvão do ambiente do laboratório, como a molécula causadora da resposta.

A primeira menção que o etileno é um produto natural de tecidos vegetais foi publicada por H. H. Cousins, em 1910, que relatou que "emanações" das laranjas armazenadas em uma câmara causavam o amadurecimento precoce das bananas, quando esses gases eram passados por uma câmara contendo os frutos. No entanto, visto que as laranjas sintetizam relativamente pouco etileno em comparação com outros frutos, como maçãs, por exemplo, é provável que as laranjas utilizadas por Cousins estivessem infectadas com o fungo *Penicillium*, produtor de grandes quantidades de etileno. Em 1934, R. Gane e colaboradores identificaram quimicamente o etileno como um produto natural do metabolismo vegetal, o qual, devido aos seus drásticos efeitos sobre a planta, foi classificado como hormônio.

Durante 25 anos, o etileno não foi reconhecido como um hormônio vegetal importante, sobretudo pelo fato de os fisiologistas acreditarem que os seus efeitos deviam-se à auxina, o primeiro hormônio vegetal a ser descoberto (ver Capítulo 19). Acreditava-se que a auxina era o principal hormônio vegetal e considerava-se que o etileno exercia somente uma insignificante e indireta função fisiológica. Os trabalhos com etileno também foram dificultados pela falta de técnicas químicas para a sua quantificação. No entanto, após a introdução da cromatografia gasosa na pesquisa do etileno em 1959, a importância desse hormônio foi redescoberta e seu significado fisiológico como regulador do crescimento vegetal, reconhecido (Burg e Thimann, 1959).

Neste capítulo, será descrita a descoberta da rota biossintética do etileno e resumidos alguns dos efeitos importantes desse hormônio no crescimento e no desenvolvimento vegetais. No final do capítulo, serão feitas considerações sobre a atuação do etileno em níveis celular e molecular.

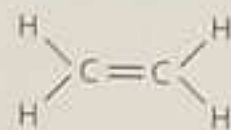
ESTRUTURA, BIOSSÍNTESE E DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE ETILENO

O etileno pode ser produzido em quase todas as partes dos vegetais superiores, embora a taxa de produção dependa do tipo de tecido e do estágio de desenvolvimento. Em geral, as regiões meristemáticas e as regiões dos nós são as mais ativas na síntese de etileno. Contudo, a produção do etileno aumenta também durante a abscisão foliar e a senescência da flor, bem como durante o amadurecimento de frutos. Qualquer tipo de lesão pode induzir a biossíntese do etileno, assim como o estresse fisiológico provocado por inundação, resfriamento, moléstias, temperatura ou estresse hídrico.

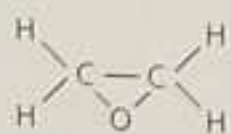
O aminoácido metionina é o precursor do etileno e o ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) funciona como um intermediário na conversão da metionina em etileno. Conforme será visto, a rota completa é um ciclo, ocorrendo entre muitos ciclos metabólicos que funcionam nas células vegetais.

As propriedades do etileno são falsamente simples

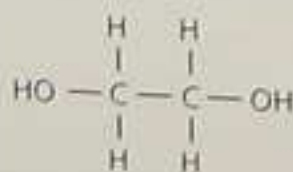
O etileno é a mais simples olefina conhecida (seu peso molecular é 28), sendo mais leve que o ar sob condições fisiológicas:

$$H_2C=CH_2$$

Etileno

É inflamável e rapidamente sofre oxidação. O etileno pode ser oxidado a óxido de etileno:

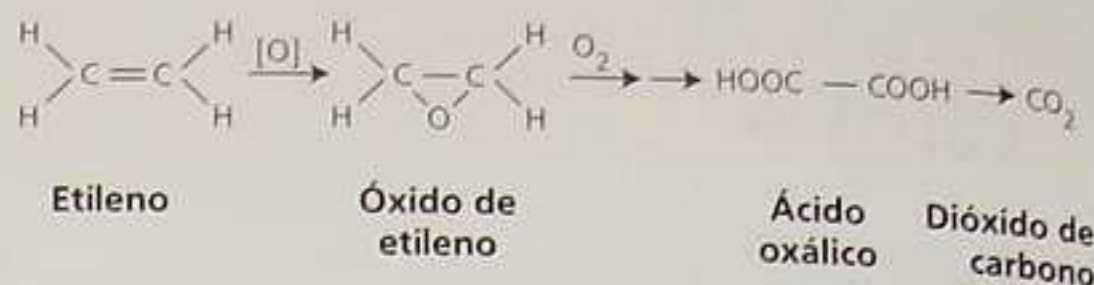
$$H_2C\!-\!CH_2 \text{ (com ponte de O)}$$

Óxido de etileno

e pode ser hidrolisado a etileno glicol:

$$HO-CH_2-CH_2-OH$$

Etileno glicol

Em muitos tecidos vegetais, o etileno pode ser completamente oxidado a CO_2, segundo a reação:

Oxidação completa do etileno

$$H_2C=CH_2 \xrightarrow{[O]} H_2C\!-\!CH_2\,(O) \xrightarrow{O_2} HOOC-COOH \rightarrow CO_2$$

Etileno — **Óxido de etileno** — **Ácido oxálico** — **Dióxido de carbono**

O etileno é facilmente liberado dos tecidos e se difunde como gás através dos espaços intercelulares para o exterior do tecido. A concentração do etileno de 1 $\mu L\ L^{-1}$ na fase gasosa, a 25 °C, corresponde à concentração de $4,4 \times 10^{-9}$ *M* do etileno na água. Devido a facilidade na medição, são geralmente utilizadas as concentrações do etileno na fase gasosa.

Uma vez que o gás etileno é perdido dos tecidos com facilidade, podendo afetar outros órgãos e tecidos, são utilizados sistemas de captura desse hormônio durante o armazenamento de frutos, vegetais e flores. O permanganato de potássio ($KMnO_4$) é um absorvente eficiente do etileno e pode reduzir de 250 para 10 $\mu L\ L^{-1}$ a concentração desse hormônio nos locais de armazenamento de maçãs, aumentando o tempo de estocagem de tais frutos.

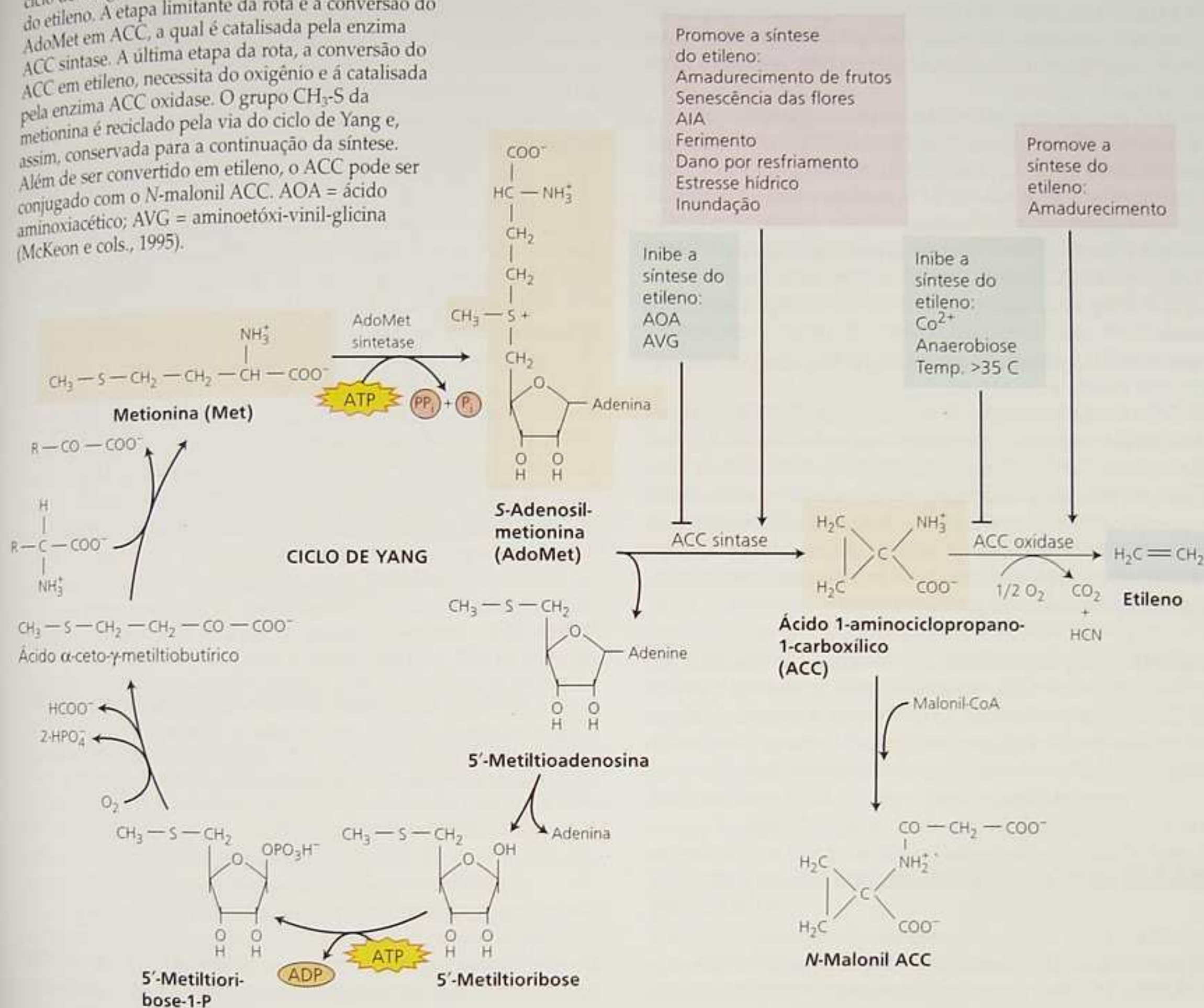
Bactérias, fungos e órgãos vegetais produzem etileno

Mesmo longe das cidades e da poluição do ar provocada pelas indústrias, raramente o ambiente está livre do etileno, pois ele é produzido pelas plantas e microrganismos. A produção do etileno nos vegetais é mais elevada nos tecidos senescentes e nos frutos em amadurecimento (> 1,0 nL g peso fresco^{-1} h^{-1}), mas todos os órgãos das plantas superiores podem sintetizar esse hormônio. O etileno é biologicamente ativo em concentrações muito baixas — menos que uma parte por milhão (1 $\mu L\ L^{-1}$). Tem sido registrado que a concentração interna do etileno em uma maçã durante o amadurecimento é superior a 2.500 $\mu L\ L^{-1}$.

Folhas jovens em desenvolvimento produzem mais etileno do que folhas completamente expandidas. As folhas jovens de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) produzem 0,4 nL $g^{-1}\ h^{-1}$, comparadas com 0,04 nL $g^{-1}\ h^{-1}$ das mais velhas. Com poucas exceções, tecidos não-senescentes lesionados ou mecanicamente perturbados aumentam temporariamente várias vezes a sua produção de etileno no período de 30 minutos. Posteriormente, os níveis de etileno retornam ao normal.

As gimnospermas e as plantas inferiores, incluindo pteridófitas, musgos, briófitas e certas cianobactérias, apresentam a capacidade de produzir etileno. A produção do etileno pelos fungos e bactérias contribui significativamente para o teor desse hormônio no solo. Certas cepas da bactéria intestinal *Escherichia coli* e de leveduras (um fungo) produzem grandes quantidades de etileno a partir da metionina.

Inexistem evidências que tecidos sadios de mamíferos produzam etileno nem que este hormônio apresenta-se como um produto metabólico de vertebrados. Contudo, recentemente foi descoberto que tanto as esponjas marinhas quanto as célula de mamíferos podem responder ao etileno, aumentando a possibilidade de que esta molécula gasosa aja como uma molécula sinalizadora em células animais (Perovic e cols., 2001).

FIGURA 22.1 A rota biossintética do etileno e o ciclo de Yang. O aminoácido metionina é o precursor do etileno. A etapa limitante da rota é a conversão do AdoMet em ACC, a qual é catalisada pela enzima ACC sintase. A última etapa da rota, a conversão do ACC em etileno, necessita do oxigênio e á catalisada pela enzima ACC oxidase. O grupo CH_3-S da metionina é reciclado pela via do ciclo de Yang e, assim, conservada para a continuação da síntese. Além de ser convertido em etileno, o ACC pode ser conjugado com o *N*-malonil ACC. AOA = ácido aminoxiacético; AVG = aminoetóxi-vinil-glicina (McKeon e cols., 1995).

A regulação da biossíntese determina a atividade fisiológica do etileno

Experimentos *in vivo* demonstraram que os tecidos vegetais convertem o 1-[^{14}C]metionina em [^{14}C]etileno e que o etileno é derivado dos carbonos 3 e 4 da metionina (Figura 22.1). O grupo CH_3-S da metionina é reciclado pelo ciclo de Yang. Sem tal reciclagem, a quantidade de enxofre reduzida iria limitar a disponibilidade de metionina e a síntese de etileno. A *S*-adenosilmetionina (AdoMet), sintetizada a partir da metionina e ATP, é um intermediário na rota de biossíntese de etileno e o precursor imediato deste hormônio é o **ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC)** (ver Figura 22.1).

O papel do ACC evidencia-se em experimentos com plantas tratadas com [^{14}C]metionina. Sob condições anaeróbicas, o etileno não foi produzido a partir da [^{14}C]metionina e o ACC marcado foi acumulado no tecido. No entanto, a exposição ao oxigênio fez surgir o etileno. O ACC marcado foi rapidamente convertido a etileno na presença do oxigênio em vários tecidos vegetais, sugerindo que o ACC é o precursor imediato do etileno nas plantas superiores e que o oxigênio é necessário para a conversão.

Em geral, quando o ACC é suplementado de forma exógena ao tecido vegetal, a produção do etileno aumenta de maneira substancial. Essa observação indica que a síntese do ACC é em geral a etapa biossintética que limita a produção do etileno nos tecidos vegetais.

A **ACC sintase,** enzima que catalisa a conversão do AdoMet a ACC (ver Figura 22.1), tem sido caracterizada em muitos tipos de tecidos de várias plantas. A ACC sintase constitui-se em uma enzima citosólica instável. Seu nível é regulado pelo ambiente e por fatores internos, tais como ferimentos, estresse hídrico, inundação e auxina. Pelo fato de a ACC sintase estar presente em tão baixa quantidade nos tecidos vegetais (0,0001% do total de proteínas do tomate maduro) e ser muito instável, é difícil purificar essa enzima para as análises bioquímicas (ver **Tópico 22.1 na Internet**).

A ACC sintase é codificada por membros de uma família multigênica divergente, os quais são diferencialmente regulados por vários indutores da biossíntese do etileno. No tomateiro, por exemplo, existem pelo menos nove genes para a ACC sintase, dos quais diferentes subgrupos são induzidos por auxina, ferimento e/ou amadurecimento do fruto.

A **ACC oxidase** catalisa a última etapa na síntese do etileno: a conversão do ACC em etileno (ver Figura 22.1). Em tecidos que apresentam altas taxas de produção de etileno, como frutos em amadurecimento, a atividade da ACC oxidase pode ser o fator limitante na etapa de síntese do etileno. O gene que codifica a ACC oxidase já foi clonado (ver **Tópico 22.2 na Internet**). Assim como a ACC sintase, a ACC oxidase é codificada por uma família multigênica, que é regulada diferencialmente. Por exemplo, em frutos de tomateiro em amadurecimento e flores de petúnia senescentes, os níveis de mRNA de um subgrupo de genes para ACC oxidase são bastante elevados.

A dedução da seqüência de aminoácidos de ACC oxidases revelou que essas enzimas pertencem à superfamília do Fe^{2+}/ascorbato oxidase. Tal semelhança sugere que a ACC oxidase deve necessitar de Fe^{2+} e ascorbato para a sua atividade — uma necessidade que foi confirmada pela análise bioquímica da proteína. A baixa quantidade da ACC oxidase e sua necessidade por cofatores, presumivelmente, explicam por que a purificação dessa enzima confundiu os pesquisadores por tantos anos.

Catabolismo. Os pesquisadores têm estudado o catabolismo do etileno pela adição do $^{14}C_2H_4$ ao tecido vegetal e rastreando os compostos radioativos produzidos. O dióxido de carbono, óxido de etileno, etileno glicol e a glicose conjugada do etileno glicol foram identificados como produtos de quebras metabólicas. Contudo, uma vez que certas olefinas cíclicas, como o 1,4-cicloexadieno, bloqueiam a quebra do etileno sem inibir a ação do etileno, parece que o catabolismo do etileno não possui um papel significante na regulação dos níveis deste hormônio (Raskin e Beyer, 1989).

Conjugação. Nem todo o ACC encontrado no tecido é convertido em etileno. O ACC pode ser convertido a uma forma conjugada, *N*-malonil ACC (ver Figura 22.1), que não parece ser degradado e acumulado no tecido.

Uma segunda forma conjugada do ACC, o ácido 1-ciclopropano-1-carboxílico (γ-L-glutamilamino) (GACC), foi também identificada. A conjugação do ACC pode ter um importante papel no controle da biossíntese do etileno, de forma análoga à conjugação da auxina e da citocinina.

O estresse ambiental e as auxinas promovem a síntese do etileno

A síntese do etileno é estimulada por vários fatores, incluindo o estádio de desenvolvimento, condições ambientais, outros hormônios vegetais e lesões físicas e químicas. A biossíntese do etileno também varia de maneira circadiana, ocorrendo picos durante o dia e atingindo o mínimo durante a noite.

Amadurecimento de frutos. Quando o fruto amadurece, a taxa do ACC e a biossíntese do etileno aumentam. A atividade enzimática, tanto da ACC oxidase (Figura 22.2) quanto da ACC sintase é aumentada, bem como os níveis de mRNA de subgrupos de genes que codificam cada enzima. Contudo, a aplicação do ACC em frutos não-maduros apenas aumenta levemente a produção do etileno, indicando que um aumento na atividade da ACC oxidase é a etapa limitante do amadurecimento (McKeon e cols., 1995).

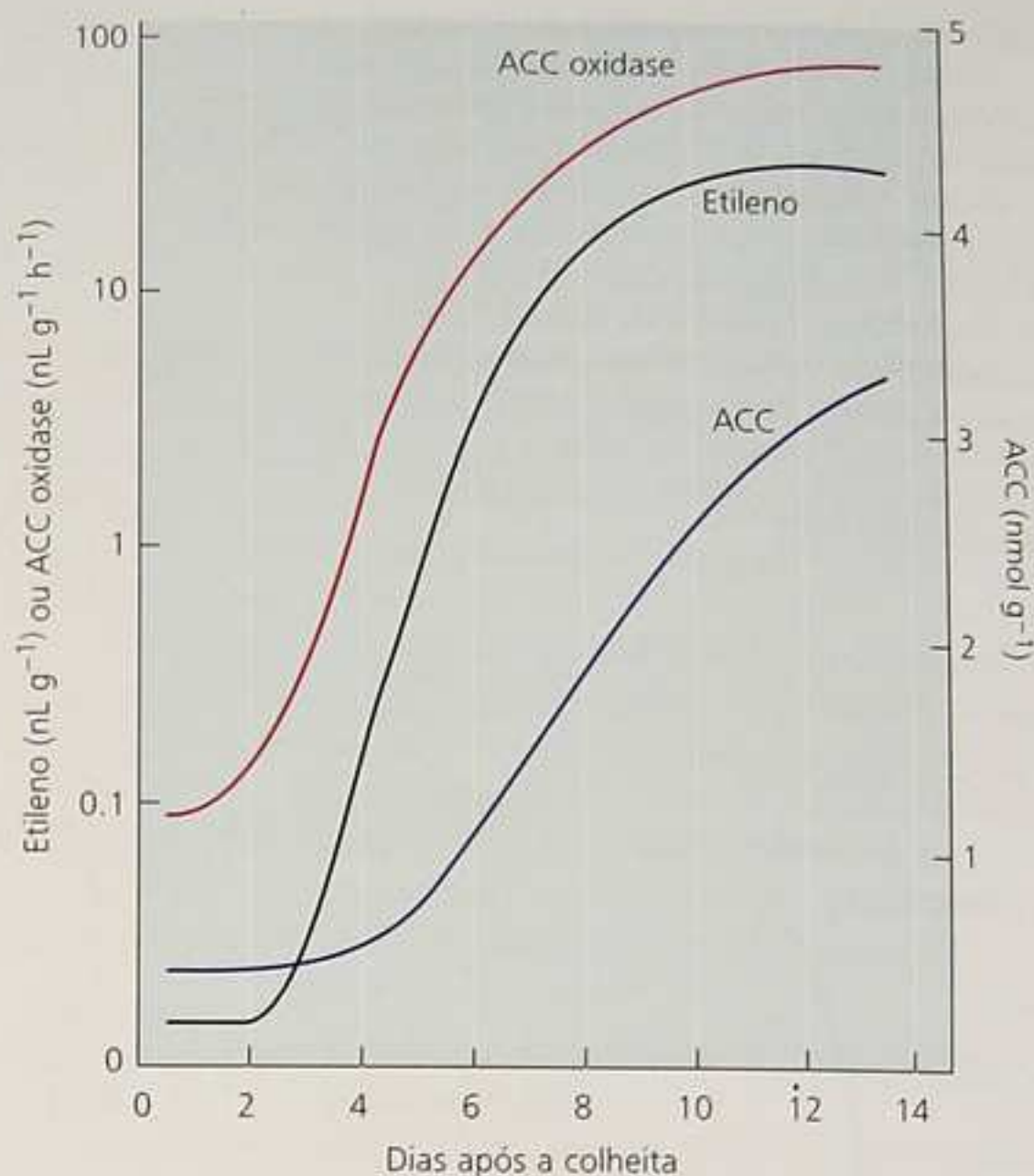



FIGURA 22.2 Variação no teor do etileno e de ACC, bem como na atividade da ACC oxidase, durante o amadurecimento de frutos. Alterações na atividade da ACC oxidase e na concentração do etileno e de ACC em maçãs da variedade Golden Delicious. Os dados estão plotados em função dos dias após a colheita. O aumento na concentração do etileno e de ACC e na atividade da ACC oxidase estão estreitamente relacionados ao amadurecimento (B de Yang, 1987).

Produção de etileno induzida por estresse. A síntese de etileno é elevada pelas condições de estresse, tais como seca, inundação, resfriamento, exposição ao ozônio ou ao ferimento mecânico. Em todos os casos, o etileno é produzido por uma via biossintética comum e o aumento na sua produção é o resultado, pelo menos em parte, de um aumento na transcrição do mRNA da ACC sintase. Esse "etileno de estresse" está envolvido no início da resposta ao estresse, como a abscisão foliar, senescência, regeneração de lesões e aumento na resistência a moléstias (ver Capítulo 25).

Produção de etileno induzida por auxina. Em alguns casos, a auxina e o etileno provocam respostas semelhantes nas plantas, como a indução da floração em abacaxi e a inibição do alongamento de caules. Tais respostas podem ser devido à capacidade das auxinas em promover a síntese de etileno pelo aumento da atividade da ACC sintase. Essas observações sugerem que algumas respostas anteriormente atribuídas à auxina (ácido indol-3-acético ou AIA) devem-se, na verdade, à produção do etileno em resposta à auxina.

Inibidores da síntese de proteínas bloqueiam tanto a síntese de ACC quanto a de etileno induzida pela auxina, indicando que a síntese de uma nova proteína ACC promovida causada pela auxina ocasiona um aumento marcante na produção de etileno. Vários genes que codificam a ACC sintase foram identificados, cujos níveis de transcrição são elevados após a aplicação exógena do AIA, sugerindo que o aumento na transcrição é, pelo menos em parte, responsável pelo aumento na produção de etileno em resposta à auxina (Nakagawa e cols., 1991; Liang e cols., 1992).

Regulação pós-transcricional da produção de etileno. A produção de etileno pode também ter uma regulação pós-transcricional. Em alguns tecidos vegetais a citocinina igualmente promove a biossíntese do etileno. Por exemplo, em plântulas estioladas de *Arabidopsis*, a aplicação exógena de citocininas provoca o aumento na produção de etileno, resultando em um fenótipo de resposta tríplice (ver Figura 22.5A).

Estudos genéticos e moleculares em *Arabidopsis* têm demonstrado que as citocininas aumentam a biossíntese do etileno pelo aumento da estabilidade e/ou atividade de uma isoforma da ACC sintase (Vogel e cols., 1998). O domínio carboxiterminal da isoforma ACC sintase parece ser o alvo desta regulação pós-transcricional. Coerente com essa idéia, foi demonstrado que o domínio carboxiterminal de uma isoforma da ACC sintase do tomateiro é o alvo de uma fosforilação dependente de cálcio (Tatsuki e Mori, 2001).

A produção e a ação do etileno podem ser inibidas

Inibidores da síntese ou da ação de hormônios são valiosos para o estudo das rotas biossintéticas e dos papéis fisiológicos de tais substâncias. Os inibidores são sobremaneira úteis nos casos em que é difícil distinguir entre diferentes hormônios que apresentam efeitos idênticos nos tecidos vegetais ou quando um hormônio afeta a síntese ou a ação de um outro hormônio.

Por exemplo, o etileno mimetiza altas concentrações de auxina, provocando a epinastia (a curvatura das folhas para baixo) e a inibição do crescimento do caule. A utilização de inibidores da biossíntese e da ação do etileno possibilita distinguir entre as ações das auxinas e do etileno. Os estudos utilizando inibidores mostram que o etileno é o agente primário da epinastia e que a auxina age indiretamente, causando um aumento substancial na produção do etileno.

Inibidores da síntese de etileno. O **aminoetóxi-vinil-glicina (AVG)** e o **ácido aminoxiacético (AOA)** bloqueiam a conversão do AdoMet a ACC (ver Figura 22.1). O AVG e o AOA são conhecidos inibidores de enzimas que utilizam o co-fator piridoxal fosfato. O íon cobalto (Co^{2+}) é também um inibidor da rota de síntese do etileno, bloqueando a conversão do ACC em etileno realizada pela ACC oxidase, a última etapa na biossíntese do etileno.

Inibidores da ação de etileno. A maioria dos efeitos do etileno pode ser antagonizada por inibidores específicos. Íons prata (Ag^+) aplicados como nitrato de prata ($AgNO_3$) ou como tiossulfato de prata ($Ag(S_2O_3)_2^{3-}$) são potentes inibidores da ação de etileno. A prata é muito específica; a inibição que ela causa não pode ser induzida por nenhum outro íon metálico.

O dióxido de carbono em altas concentrações (entre 5 e 10%) também inibe muitos efeitos do etileno, como a indução do amadurecimento de frutos, embora o CO_2 seja menos eficiente que o Ag^+. Esse efeito do CO_2 tem sido utilizado no armazenamento de frutos cujo amadurecimento é retardado sob concentrações elevadas de CO_2. As altas concentrações de CO_2 necessárias para a inibição tornam improvável a sua ação como antagonista do etileno sob condições naturais.

O composto volátil *trans*ciclooctano, mas não o seu isômero *cis*-ciclooctano, é um forte inibidor competitivo da ligação de etileno (Sisler e cols., 1990); considera-se que o *trans*ciclooctano atue competindo com o etileno pela ligação ao receptor. Foi recentemente descoberto um novo inibidor, o **1-aminociclopropano (MCP)**, que age ligando-se irreversivelmente ao receptor de etileno (Figura 22.3) (Sisler e Serek, 1997). O MCP representa um extraordinário potencial de uso comercial.

O etileno pode ser medido por cromatografia gasosa

Historicamente, os bioensaios, utilizados para medir os níveis de etileno baseados na resposta tríplice de plântulas, foram substituídos pela **cromatografia gasosa.** Pequenas quantidades como cinco partes por bilhão (ppb) (5 pL por litro)[1] de etileno podem ser detectadas e analisadas de um a cinco minutos.

Em geral, o etileno produzido por um tecido vegetal é acumulado em um frasco selado e a amostra é retirada com uma seringa. A amostra é injetada em uma coluna do cromatógrafo gasoso onde os diferentes gases são separados e detectados por um detector de chama de ionização. A quantificação do etileno por esse método é muito precisa. Recentemente, um novo método para medir o etileno foi desenvolvido; ele utiliza um detector fotoacústico a *laser*, passível de detectar pequenas quantidades como 50 partes por trilhão (50 ppt = 0,05 pL L^{-1}) de etileno (Voesenek e cols., 1997).

EFEITOS DO ETILENO NO DESENVOLVIMENTO E NA FISIOLOGIA

Conforme foi visto, o etileno foi descoberto por seu efeito no crescimento de plântulas e no amadurecimento de frutos. Tem sido demonstrado que o etileno regula várias respostas nos vegetais, incluindo a germinação de sementes, a expansão celular, a diferenciação celular, o florescimento, a senescência e a abscisão. Nesta

H_3C

1-metilciclopropano (MCP) — ***trans*ciclooctano** — ***cis*ciclooctano**

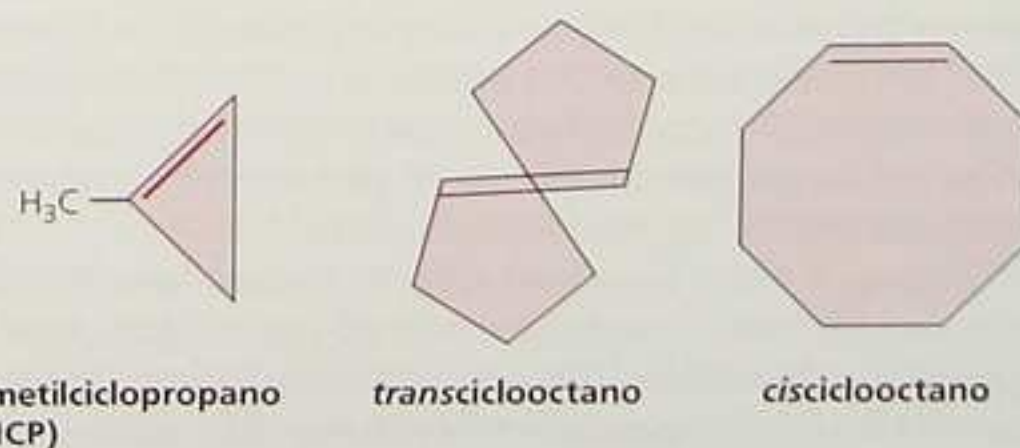



FIGURA 22.3 Inibidores que bloqueiam a ligação do etileno ao receptor. Apenas a forma *trans* do ciclopropano é ativa.

[1]pL = picolitro = 10^{-12} L.

seção, serão considerados, com mais detalhes, os efeitos fenotípicos do etileno.

O etileno promove o amadurecimento de alguns frutos

No dia-a-dia, o termo *amadurecimento de frutos* refere-se a mudanças no fruto que o tornam pronto para ser consumido. Tais mudanças incluem caracteristicamente o amolecimento do fruto, devido à quebra enzimática das paredes celulares, à hidrólise do amido, ao acúmulo de açúcares e ao desaparecimento de ácidos orgânicos e de compostos fenólicos, incluindo os taninos. Sob uma perspectiva da planta, o amadurecimento do fruto indica que as sementes já estão prontas para serem dispersadas.

Para as sementes cuja dispersão depende da ingestão por animais, *amadurecimento* e *comestibilidade* são sinônimos. O brilho colorido das antocianinas e carotenóides, freqüentemente acumulados na epiderme desses frutos, aumenta a sua visibilidade. Contudo, para sementes que contam com recurso mecânico ou outro qualquer para a dispersão, o *amadurecimento do fruto* pode resultar na desidratação e na abertura. Devido à sua importância na agricultura, a grande maioria dos estudos sobre o amadurecimento de frutos tem enfocado frutos comestíveis.

Por muito tempo, o etileno tem sido reconhecido como o hormônio que acelera o amadurecimento de frutos. A exposição desses frutos ao etileno apressa os processos relacionados ao amadurecimento, sendo que um drástico aumento na produção de etileno acompanha o início do amadurecimento. No entanto, a avaliação de um grande número de frutos tem demonstrado que nem todos respondem ao etileno.

Todos os frutos que amadurecem em resposta ao etileno exibem, antes da fase de amadurecimento, um aumento característico da respiração, chamado de **climatério**[2]. Tais frutos também apresentam um pico na produção de etileno, imediatamente antes do aumento da respiração (Figura 22.4). Visto que o tratamento com etileno induz o fruto a produzir etileno adicional, essa reação pode ser descrita como **autocatalítica**. Maçãs, bananas, abacates e tomates são exemplos de frutos climatéricos.

Em contraste, frutos cítricos e uvas não exibem aumento na respiração e na produção do etileno são chamados de frutos **não-climatéricos.** Outros exemplos de frutos climatéricos e não climatéricos são apresentados na Tabela 22.1.

Quando frutos não-maduros e climatéricos são tratados com etileno, o início do climatério é acelerado. Quando frutos não-climatéricos são tratados da mesma forma, a magnitude do aumento respiratório ocorre em função da concentração do etileno, porém o tratamento não desencadeia a produção endógena do etileno nem acelera o amadurecimento. A explicação do papel do etileno no amadurecimento de frutos climatéricos resultou em muitas aplicações práticas que visam uniformizar ou retardar o amadurecimento.

Embora o efeito do etileno exógeno no amadurecimento de frutos seja evidente, o estabelecimento de uma relação causal entre o nível endógeno do etileno e o amadurecimento de frutos é mais difícil. Os inibidores da biossíntese do etileno (como o AVG) ou da ação do etileno (como CO_2, MCP ou Ag^+) têm retardado ou mesmo evitado o amadurecimento. Entretanto, a demonstração definitiva sobre a necessidade do etileno para o amadurecimento de frutos foi fornecida por experimentos nos quais a biossíntese desse hormônio foi bloqueada pela expressão de uma versão anti-senso da ACC sintase ou da ACC oxidase em plantas transgênicas de tomateiro (ver **Tópico 22.3 na Internet**). A eliminação da biossíntese do etileno nesses tomateiros transgênicos bloqueia completamente o amadurecimento dos frutos, sendo o amadurecimento restaurado pela aplicação exógena de etileno (Oeller e cols., 1991).

Outras demonstrações da necessidade do etileno para o amadurecimento de frutos vêm da análise da mutação *never-ripe* (em português, *nuncamaduro*) em tomateiro. Conforme o nome indica, essa mutação bloqueia completamente o amadurecimento dos

FIGURA 22.4 Produção de etileno e respiração. O amadurecimento em banana é caracterizado por um aumento climatérico na taxa de respiração, conforme evidenciado pelo aumento na produção de CO_2. O aumento climatérico na produção de etileno precede o aumento na produção de CO_2 sugerindo que o etileno é o hormônio que desencadeia o processo de amadurecimento (Burg e Burg, 1965).

TABELA 22.1
Frutos climatéricos e não-climatéricos

Climatéricos	Não-climatéricos
Maçã	Pimenta doce
Abacate	Cereja
Banana	Citros
Melão	Abacaxi
Querimólia	Feijão de corda
Figo	Morango
Manga	Melancia
Azeitona	Uva
Pêssego	
Pêra	
Caqui	
Ameixa	
Tomate	

[2]O termo *climatério* pode ser utilizado tanto como substantivo — "muitos frutos apresentam um climatério durante o amadurecimento" — quanto como adjetivo — "um aumento climatérico da respiração". Contudo, o termo *não-climatérico* é utilizado somente como adjetivo.

frutos do tomateiro. Análises moleculares revelaram que o *never-ripe* deve-se a uma mutação de um receptor do etileno que confere a incapacidade de ligação com esse hormônio (Lanahan e cols., 1994). Tais experimentos forneceram uma prova evidente do papel do etileno no amadurecimento de frutos e abriram as portas para a manipulação do amadurecimento por meio da biotecnologia.

Em tomateiro têm sido identificados vários genes altamente regulados durante o amadurecimento (Gray e cols., 1994). Durante o amadurecimento do tomate, o amolecimento do fruto é o resultado da hidrólise da parede celular e a mudança do verde para o vermelho ocorre em conseqüência da perda da clorofila e da síntese do pigmento carotenóide licopeno. Ao mesmo tempo, são produzidos os componentes do aroma e do sabor.

Análises do mRNA de frutos de tomateiros tipo selvagem e de plantas geneticamente modificadas para a deficiência em etileno revelaram que a expressão gênica durante o amadurecimento é regulada por pelo menos duas rotas independentes:

1. *Uma rota dependente do etileno* inclui genes envolvidos com a biossíntese do licopeno e do aroma, do metabolismo respiratório e da ACC sintase.

2. *Uma rota de desenvolvimento independente do etileno* inclui genes que codificam a ACC oxidase e clorofilase.

Assim, nem todos os processos associados ao amadurecimento em tomate são dependentes do etileno.

A epinastia da folha ocorre quando o ACC das raízes é transportado para a parte aérea

A curvatura das folhas para baixo, que ocorre quando o lado superior (adaxial) do pecíolo cresce mais rápido do que o lado inferior (abaxial), é chamado de **epinastia** (Figura 22.5B). O etileno e as altas concentrações de auxina induzem a epinastia e, atualmente, está confirmado que a auxina age indiretamente pela indução da produção do etileno. Conforme será discutido posteriormente neste capítulo, várias condições de estresse, como o estresse salino ou a infecção por patógenos, aumentam a produção de etileno e induzem a epinastia. Não se conhece a função fisiológica dessa resposta.

No tomateiro e em outras dicotiledôneas, a inundação (encharcamento) ou as condições anaeróbicas no entorno das raízes acentuam a síntese de etileno na parte aérea, levando à resposta epinástica. Uma vez que tal estresse ambiental é percebido pelas raízes e a resposta é exibida nas partes aéreas, um sinal deve ser transportado a partir das raízes até as partes aéreas. Esse sinal é o ACC, que é o precursor imediato do etileno. Foi constatado que os níveis do ACC aumentam significativamente na seiva do xilema, após as raízes do tomateiro serem inundadas por um a dois dias (Figura 22.6) (Bradford e Yang, 1980).

Devido ao preenchimento dos espaços aéreos do solo pela água e à baixa difusão do O_2 na água, a concentração do oxigênio ao redor das raízes inundadas diminui drasticamente. O aumento na produção de etileno parece ser causado pelo acúmulo do ACC nas raízes sob condições anaeróbicas, pois a conversão do ACC em etileno necessita de oxigênio (ver Figura 22.1). O ACC acumulado nas raízes em anaerobiose é transportado para as partes aéreas por meio da corrente de transpiração, onde ele é rapidamente convertido em etileno.

O etileno induz a expansão lateral de células

Em concentrações acima de 0,1 $\mu L\ L^{-1}$, o etileno altera o padrão de crescimento de plântulas pela redução da taxa de alongamento e aumento da expansão lateral, levando ao intumescimento da região imediatamente abaixo do gancho plumular. Tais efeitos do etileno são comuns no crescimento da parte aérea de muitas dicotiledôneas, constituindo um elemento da **resposta tríplice.** Em *Arabidopsis*, a resposta tríplice consiste na inibição e no intumescimento do hipocótilo, na inibição do alongamento da raiz e no aumento exagerado do gancho plumular (Figura 22.7).

Conforme discutido no Capítulo 15, o direcionamento da expansão da célula vegetal é determinado pela orientação das microfibrilas de celulose da parede celular. As microfibrilas transversais reforçam a parede celular nas direções laterais, de forma que a pressão de turgor é dirigida para o alongamento celular. A orientação das microfibrilas, por sua vez, é determinada pela orientação do arranjo cortical dos microtúbulos no citoplasma cortical (periférico). No arranjo típico das células vegetais em alongamento, os microtúbulos corticais estão organizados transversalmente, dando origem ao arranjo transversal das microfibrilas de celulose.

Durante a resposta tríplice das plântulas ao etileno, o padrão transversal de alinhamento dos microtúbulos é desorganizado e alterado para uma orientação longitudinal. Esta mudança de 90° na orientação dos microtúbulos leva a uma deposição paralela das microfibrilas de celulose. O novo depósito da parede é reforçado mais na direção longitudinal do que na direção transversal, promovendo a expansão lateral em vez do alongamento.

Como os microtúbulos mudam de uma orientação para a outra? Para estudar tal fenômeno, células epidérmicas de ervilha (*Pisum sativum*) foram injetadas com proteínas de microtúbulos, a tubulina, as quais possuíam um corante fluorescente covalentemente ligado. A "marca" fluorescente não interfere na polimerização dos microtúbulos. O procedimento permitiu aos pesquisadores monitorar a construção dos microtúbulos em células vivas utilizando microscopia confocal, o qual pode focalizar em diferentes planos da célula.

Foi descoberto que os microtúbulos não se reorientam a partir do sentido transversal para o longitudinal pela despolimerização completa dos microtúbulos transversais, seguida pela repolimerização de um novo arranjo longitudinal de microtúbulos. Em vez disso, ocorre o aumento do número de microtúbulos não-alinhados transversalmente, que surgem em uma posição específica (Figura 22.8). Em seguida, os microtúbulos adjacentes adotam o novo alinhamento, sendo que, em um determinado estágio, diferentes alinhamentos coexistem antes que seja adotada uma orientação longitudinal uniforme (Yung e cols., 1994). Embora as reorientações observadas neste estudo fossem mais espontâneas do que induzidas pelo etileno, presume-se que a reorientação dos microtúbulos induzida pelo etileno ocorra por um mecanismo semelhante.

Os ganchos plumulares de plântulas cultivadas no escuro são mantidos pela produção de etileno

As plântulas estioladas de dicotiledôneas são em geral caracterizadas por um pronunciado gancho, localizado imediatamente abaixo do ápice da parte aérea (ver Figura 22.7). Tal forma de gancho facilita a passagem da plântula através do solo, protegendo o delicado meristema apical.

(A)

(B)

(C)

(D)

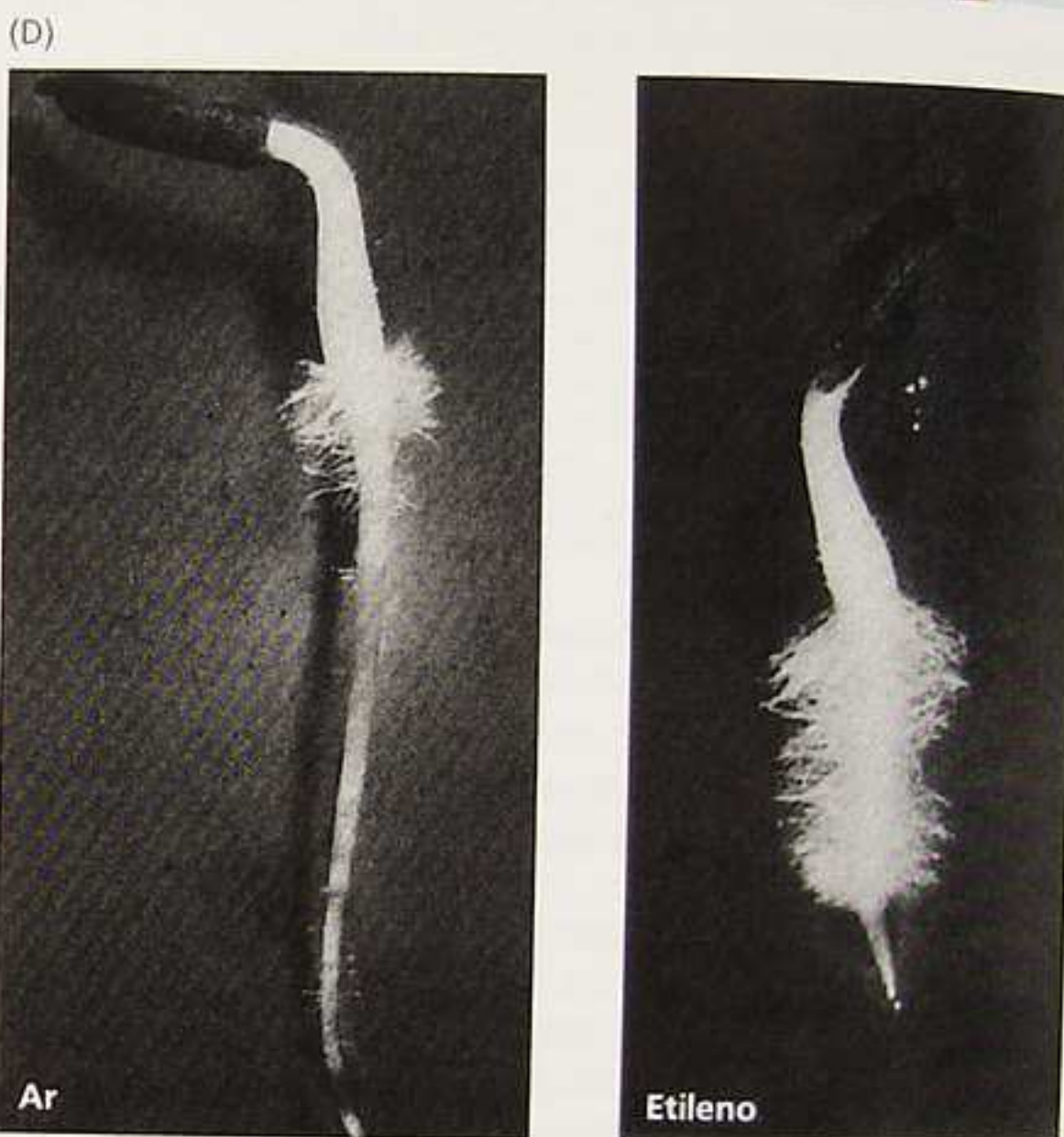
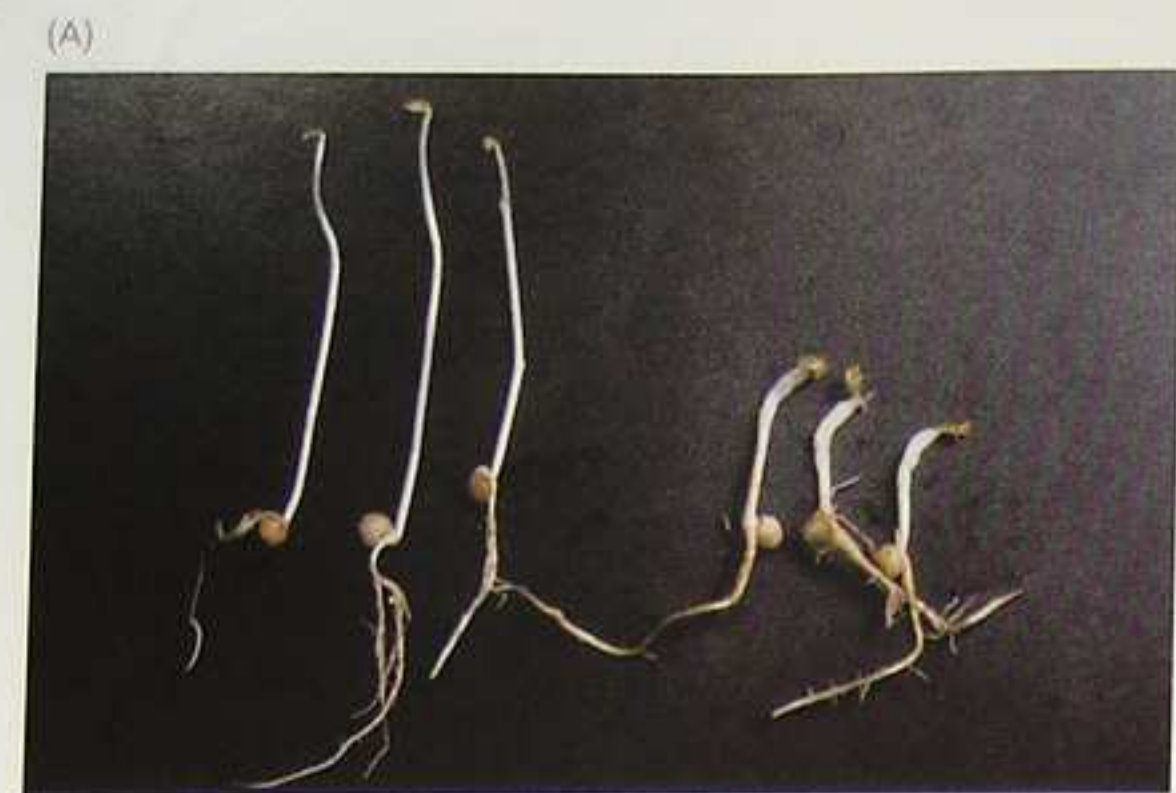



FIGURA 22.5 Alguns efeitos fisiológicos do etileno sobre tecidos vegetais em diferentes estádios de desenvolvimento. (A) Resposta tríplice de plântulas estioladas de ervilha. Plântulas de ervilha, com seis dias, foram tratadas com 10 ppm (partes por milhão) de etileno (direita) ou mantidas sem tratamento (esquerda). As plântulas tratadas apresentaram uma expansão radial, inibição do alongamento do epicótilo e um crescimento horizontal do epicótilo (diagravitropismo). (B) A epinastia, ou curvatura para baixo, de folhas de tomateiro (direita) é provocada pelo tratamento com etileno. A epinastia ocorre quando as células do lado superior do pecíolo crescem mais rápido que as células do lado inferior. (C) Inibição da senescência de flores pela inibição da ação do etileno. As flores de cravo foram mantidas em água deionizada por 14 dias com (esquerda) ou sem (direita) tiossulfato de prata (TSP), um potente inibidor da ação do etileno. O bloqueio do etileno resulta em uma marcante inibição da senescência floral. (D) O etileno promove a formação de pêlos radiculares (ver Glossário) em plântulas de alface. Plântulas de dois dias foram tratadas com ar (esquerda) ou 10 ppm de etileno (direita), por 24 horas, antes da foto ter sido obtida. Observe a profusão dos pêlos radiculares nas plântulas tratadas com etileno (A e B cedidas por S. Gepstein; C de Reid, 1995, cedida por M. Reid; D de Abeles e cols., 1992, cedida por F. Abeles).

Assim como na epinastia, a formação e a manutenção do gancho plumular resultam de um crescimento assimétrico induzido pelo etileno. A forma fechada do gancho deve-se a um rápido alongamento do lado externo do caule, comparado com o lado interno. Quando o gancho plumular é exposto à luz branca, ele abre em decorrência do aumento na taxa de alongamento do lado interno, igualando as taxas de crescimento de ambos os lados. Os aspectos relativos ao movimento mecânico de crescimento do gancho (i. é, a manutenção da forma de gancho ao longo do tempo) foram discutidos no Capítulo 16.

A luz vermelha induz a abertura do gancho plumular e a luz vermelho-distante reverte o efeito da primeira, indicando que o fitocromo é o fotorreceptor envolvido no processo (ver Capítulo 17). Existe uma estreita interação entre o fitocromo e o etileno no controle da abertura do gancho. O etileno, produzido pelo tecido do gancho, mantido no escuro, inibe o alongamento das células do lado interno. A luz vermelha inibe a formação do etileno, promovendo o crescimento do lado interno e causando a abertura do gancho.

O mutante auxina-insensível *axr1* e o tratamento de plantas selvagens com NPA (ácido *1*-N-naftilftalâmico), um inibidor do transporte polar da auxina, bloqueiam a formação do gancho plumular em *Arabidopsis*. Estes e outros resultados indicam um papel da auxina na manutenção da estrutura do gancho. A taxa de crescimento mais rápido do lado externo, em relação ao tecido inter-

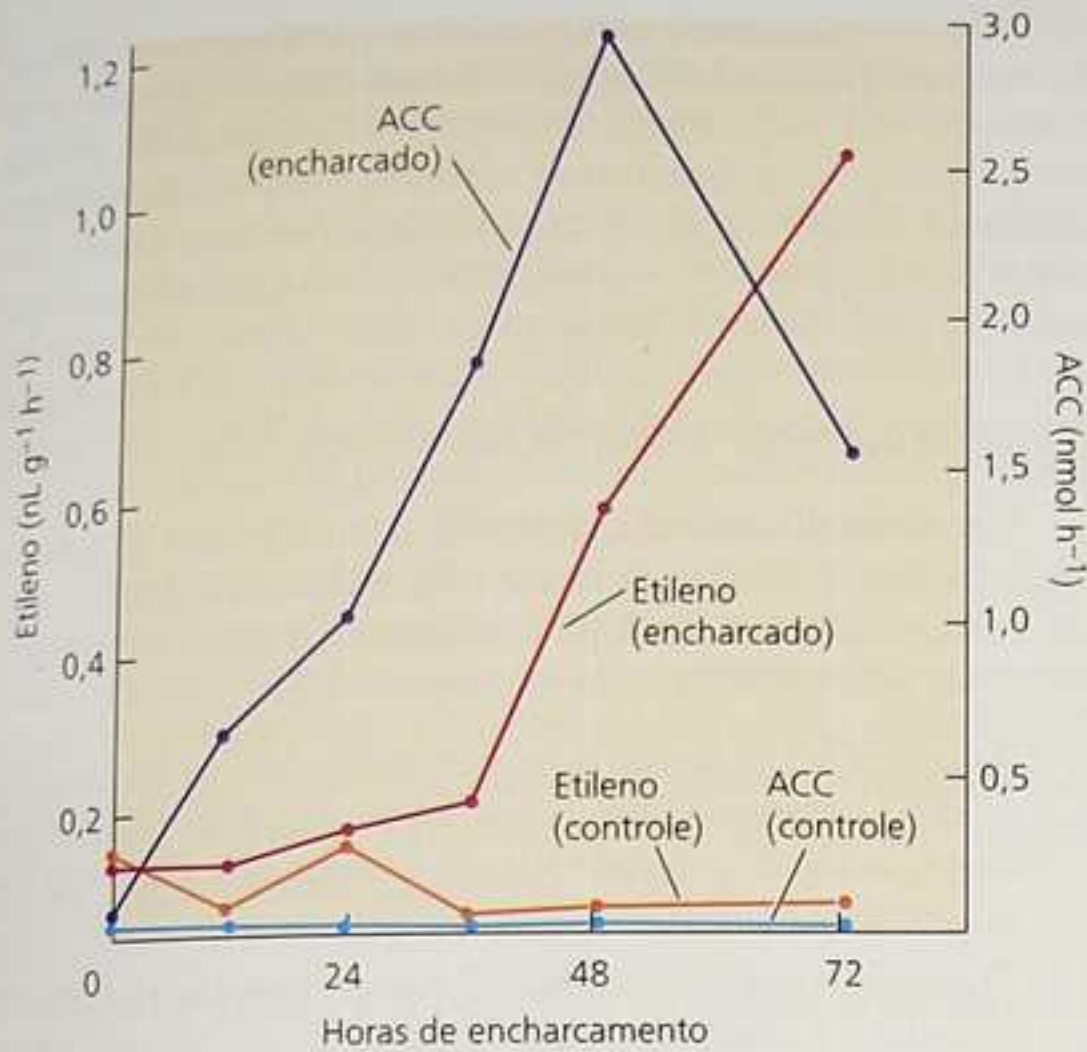



FIGURA 22.6 Variação na quantidade de ACC na seiva do xilema e a produção do etileno em pecíolos, após a inundação de plantas de tomateiro. O ACC é sintetizado nas raízes, porém é lentamente convertido em etileno sob condições anaeróbicas da inundação. O ACC é transportado via xilema para a parte aérea, onde é convertido em etileno. O etileno gasoso não pode ser transportado, de modo que geralmente afeta o tecido próximo ao local onde foi produzido. O ACC, precursor do etileno, é transportado e pode produzir etileno longe do local onde foi sintetizado (Bradford e Yang, 1980).

FIGURA 22.7 A resposta tríplice em *Arabidopsis*. Plântulas estioladas de três dias, crescidas na presença (direita) ou ausência (esquerda) de 10 ppm de etileno. Observe o encurtamento do hipocótilo, a redução do alongamento da raiz e o aumento da curvatura do gancho plumular que resulta da presença de etileno.

no, poderia indicar um gradiente de etileno dependente da auxina, análogo ao gradiente de auxina que se desenvolve durante a curvatura fototrópica (ver Capítulo 19).

Foi identificado em *Arabidopsis* um gene necessário à formação do gancho, *HOOKLESS1* (assim chamado devido à mutação neste gene resultar em plântulas sem o gancho) (Lehman e cols., 1996). A interrupção desse gene altera severamente o padrão de expressão dos genes que respondem à auxina. Quando o gene é superexpresso em *Arabidopsis*, ocorre a formação constitutiva do gancho, mesmo na presença da luz. O *HOOKLESS1* codifica a N-acetil transferase que regula hipoteticamente — por um mecanismo desconhecido — a distribuição diferencial da auxina sob indução do etileno no gancho.

O etileno quebra a dormência de gemas e sementes em algumas espécies

As sementes que não germinam sob condições normais (água, oxigênio e temperatura adequadas para a germinação) são chamadas de dormentes (ver Capítulo 23). O etileno apresenta a capacidade de quebrar a dormência e iniciar a germinação em algumas

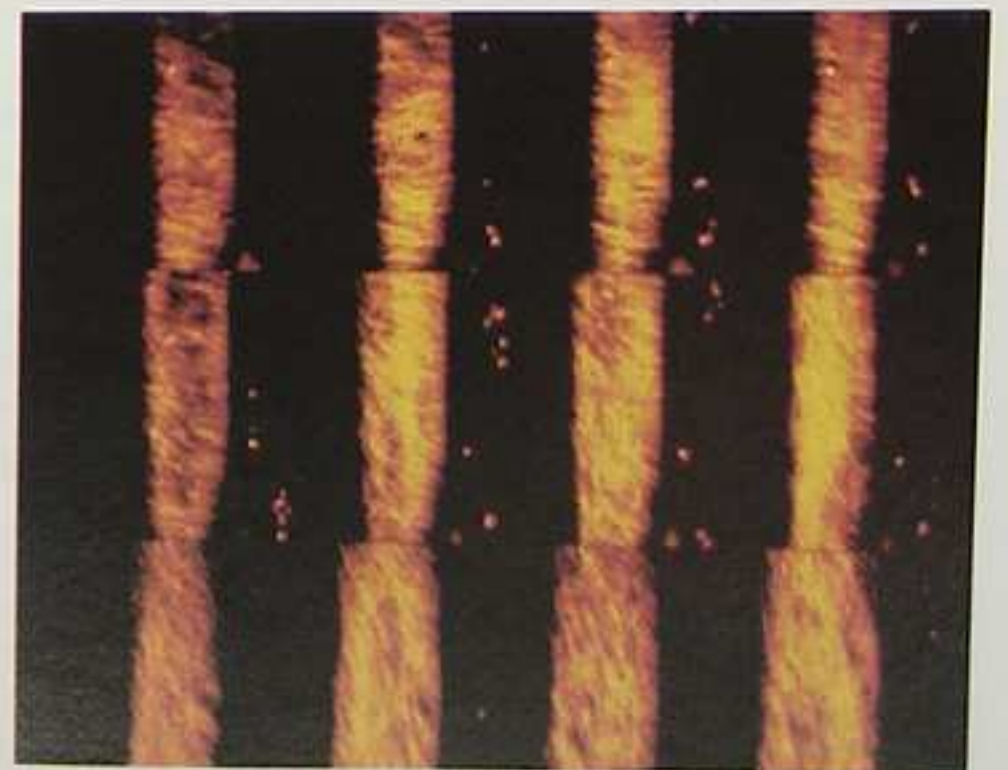



FIGURA 22.8 Reorientação dos microtúbulos, de transversal para vertical, em células epidérmicas do caule de ervilha, em resposta ao ferimento. Uma célula viva da epiderme foi microinjetada com rodamina conjugada a tubulina, que foi incorporada aos microtúbulos da planta. Uma série de tempos de aproximadamente seis minutos de intervalo mostra os microtúbulos corticais sendo reorientados de uma rede transversal para oblíqua/longitudinal. A reorientação parece envolver o surgimento de um novo conjunto "discordante" de microtúbulos em uma nova direção, concomitantemente com o desaparecimento de microtúbulos do alinhamento anterior (Yuan e cols., 1994, fotografia cedida por C. Lloyd).

espécies, como nos cereais. Além desse efeito na dormência, o etileno aumenta a taxa de germinação de sementes de várias espécies. No amendoim (*Arachis hypogaea*), existe uma estreita correlação entre a produção de etileno e a germinação. O etileno pode também quebrar a dormência de gemas, sendo algumas vezes utilizado para promover o crescimento de gemas em batata e em outros tubérculos.

O etileno promove o alongamento de espécies vegetais aquáticas submersas

Embora geralmente seja considerado como um inibidor do alongamento do caule, o etileno é capaz de promover o alongamento do caule e do pecíolo de várias plantas aquáticas submersas ou parcialmente submersas, incluindo as dicotiledôneas *Ranunculus sceleratus*, *Nymphoides peltata* e *Callitriche platycarpa*, além da pteridófita *Regnellidium diphyllum*. Um outro importante exemplo agrícola é o arroz irrigado (ver Capítulo 20).

Nessas espécies, a submersão induz o rápido alongamento dos entrenós e dos pecíolos, o que permite às folhas ou aos ramos superiores permanecerem acima da água. O tratamento com etileno mimetiza o efeito da submersão.

O crescimento de plantas submersas ocorre devido ao aumento do etileno nos tecidos. Na ausência do O_2 ocorre a diminuição da síntese de etileno, mas a perda de etileno por difusão é retardada sob a água. Quantidades suficientes de oxigênio para o crescimento e para a síntese de etileno nas partes submersas são em geral fornecidas pelo tecido do aerênquima.

Como foi visto no Capítulo 20, o etileno estimula o alongamento dos entrenós do arroz irrigado, pelo aumento da giberelina e a sensibilidade a este hormônio nas células do meristema intercalar. O aumento na sensibilidade ao GA (ácido giberélico) nessas células, em resposta ao etileno, deve-se à diminuição do nível do ácido abscísico (ABA), um potente antagonista do GA.

O etileno promove a formação de raízes e de pêlos radiculares

O etileno é capaz de induzir a formação de raízes adventícias em folhas, caules, pedúnculo floral e mesmo em outras raízes. O etileno tem sido também considerado como um regulador positivo na formação de pêlos radiculares em várias espécies (ver Figura 22.5D). Tal relação tem sido mais bem estudada em *Arabidopsis*, na qual os pêlos radiculares normalmente estão localizados nas células epidérmicas que recobrem uma junção entre as células corticais subjacentes (Dolan e cols., 1994).

Em raízes tratadas com etileno, os pêlos extras são formados em regiões anormais da epiderme, i. é, células diferenciadas em pêlos radiculares que não recobrem a junção das células corticais (Tanimoto e cols., 1995). As plântulas crescidas na presença de inibidores de etileno (como o Ag^+), bem como mutantes insensíveis ao etileno, exibem uma redução na formação de pêlos radiculares em resposta ao etileno. Tais observações sugerem que o etileno atue como um regulador positivo na diferenciação dos pêlos radiculares.

O etileno induz a floração na família do abacaxi

Embora o etileno iniba o florescimento em muitas espécies, ele induz a floração no abacaxi e em espécies relacionadas, sendo utilizado comercialmente para a sincronização do estabelecimento do fruto em plantas de abacaxi. O florescimento de outras espécies, como na manga, é também iniciado pelo etileno. Em plantas que possuem flores femininas e masculinas separadas (espécies monóicas), o etileno pode alterar o sexo das flores em desenvolvimento (ver Capítulo 24). A promoção da formação de flores femininas em pepino é um exemplo desse efeito.

O etileno aumenta a taxa de senescência foliar

Conforme descrito no Capítulo 16, a senescência é um processo geneticamente programado que afeta todos os tecidos do vegetal. Várias evidências fisiológicas sustentam o papel do etileno e das citocininas no controle da senescência foliar.

- As aplicações exógenas de etileno ou do ACC (o precursor de etileno) aceleram a senescência foliar, enquanto o tratamento com citocininas exógenas retarda a senescência foliar (ver Capítulo 21).
- O aumento na produção do etileno está associado à perda da clorofila e o desaparecimento gradual da cor, que são aspectos característicos da senescência das folhas e flores (ver Figura 22.5C); tem sido constatada uma correlação inversa entre os níveis de citocinina nas folhas e o início da senescência.
- Os inibidores da síntese do etileno (como AVG ou Co^{2+}) e da ação (como Ag^+ ou CO_2) retardam a senescência foliar.

Todos estes estudos fisiológicos sugerem que a senescência é regulada pelo balanço de etileno e de citocinina. Além disso, o ácido abscísico (ABA) tem sido envolvido no controle da senescência foliar. O papel do ABA na senescência será discutido no Capítulo 23.

Senescência no mutante para etileno. As evidências diretas do envolvimento do etileno na regulação da senescência foliar vêm dos estudos genéticos em *Arabidopsis*. Como será discutido mais adiante, vários mutantes com resposta modificada ao etileno têm sido identificados. O bioensaio empregado para identificar estes mutantes foi o teste da resposta tríplice, no qual o etileno inibe significativamente o alongamento dos hipocótilos de plântulas e promove a expansão lateral.

O mutante etileno insensível, como o *etr1* (*e*tileno *r*esistente *1*) e o *ein2* (*e*tileno *in*sensível *2*) foram identificados pela sua deficiência em responder ao etileno (como será apresentado mais adiante). O mutante *etr1* é incapaz de perceber o sinal do etileno devido à mutação no gene que codifica a proteína receptora de etileno; o mutante *ein2* bloqueia a última etapa na rota de transdução de sinal.

Coerente com o papel do etileno na senescência foliar, tanto o mutante *etr1* quanto o *ein2* foram afetados não apenas durante os estádios iniciais da germinação, mas ao longo do ciclo de vida, incluindo a senescência (Zacarias e Reid, 1990; Hensel e cols., 1993; Grbic e Bleecker, 1995). Os mutantes para etileno mantiveram a clorofila e outros componentes do cloroplasto por períodos mais longos do que os tipos não-mutantes. No entanto, devido ao tempo de vida total desses mutantes ter aumentado somente 30% além daquele observado para o tipo não-mutante, o etileno parece agir mais no aumento da *taxa* de senescência do que como um iniciador do processo de senescência.

O uso da engenharia genética para provar a senescência. Uma outra abordagem genética muito útil que fornece evidência direta

da função de gene(s) específico(s) é baseada nas plantas transgênicas. Por meio da tecnologia da engenharia genética, foram confirmados tanto os papéis do etileno quanto das citocininas na regulação da senescência foliar.

Uma maneira de impedir a expressão de um gene é transformar a planta com o DNA anti-senso, que consiste do gene de interesse em orientação inversa em relação ao promotor. Quando o gene anti-senso é transcrito, o mRNA anti-senso resultante é complementar ao mRNA senso e hibridizará com este último. Visto que um RNA dupla fita é rapidamente degradado na célula, o efeito do gene anti-senso é esgotar o mRNA senso da célula.

Plantas transgênicas que expressam versões anti-senso de genes que codificam enzimas da via biossintética do etileno, tais como a ACC sintase e a ACC oxidase, podem sintetizar o etileno somente em níveis muito baixos. Coerente com o papel do etileno na senescência, tais mutantes anti-senso têm exibido atraso na senescência foliar, bem como no amadurecimento de frutos no tomateiro (ver **Tópico 22.1 na Internet**).

A função do etileno nas respostas de defesa é complexa

As infecções de patógenos e as doenças ocorrerão somente se as interações entre o hospedeiro e o patógeno forem geneticamente compatíveis. No entanto, a produção de etileno em geral aumenta em resposta ao ataque do patógeno, tanto nas interações compatíveis (i. é, patogênicas) quanto nas não-compatíveis (não-patogênicas).

A descoberta de mutantes etileno-insensíveis tem permitido avaliar a função do etileno na resposta a vários patógenos. A idéia que surge é que o envolvimento do etileno na patogênese é complexo e depende da interação particular hospedeiro-patógeno. Por exemplo, o bloqueio da resposta do etileno não afeta a resposta de resistência à bactéria *Pseudomonas* em *Arabidopsis* ou ao vírus do mosaico no tabaco. Entretanto, nas interações compatíveis desses patógenos e hospedeiros, a eliminação da sensibilidade ao etileno evita o desenvolvimento do sintoma da doença, ainda que o crescimento do patógeno não seja afetado.

Por outro lado, o etileno, em combinação com o ácido jasmônico (ver Capítulo 13), é necessário para a ativação de diversos genes de defesa da planta. Além disso, o tabaco e a *Arabidopsis* mutantes etileno-insensíveis tornam-se suscetíveis a vários fungos necrotróficos patogênicos de solo (que destroem as células), que não são em geral patógenos vegetais. Assim, o etileno parece estar envolvido na resposta de resistência a alguns patógenos, mas não de outros.

A biossíntese de etileno na zona de abscisão é regulada pela auxina

A queda de folhas, frutos, flores e outros órgãos vegetais é denominada abscisão (ver **Tópico 22.4 na Internet**), cuja ocorrência dá-se em camadas específicas de células, chamadas de **camadas de abscisão**, as quais se tornam morfológica e bioquimicamente diferenciadas durante o desenvolvimento do órgão. O enfraquecimento das paredes celulares na camada de abscisão depende de enzimas que degradam a parede celular, como a celulase e a poligalacturonase (Figura 22.9).

A capacidade do gás etileno em causar desfolhação em árvores de bétula é apresentada na Figura 22.10. A árvore do tipo selvagem à esquerda perdeu todas as folhas. A árvore à direita foi transformada com um gene de *Arabidopsis* para o receptor de etileno ETR1-1, o qual possui uma mutação dominante (discutido na próxima seção). Essa árvore é incapaz de responder ao etileno e não perde suas folhas após o tratamento com tal hormônio.

O etileno parece ser o principal regulador do processo de abscisão, com a auxina agindo como um supressor do efeito do etileno (ver Capítulo 19). Entretanto, concentrações supra-ótimas de auxina estimulam a produção de etileno, o que tem levado o uso de análogos de auxina como desfolhantes. Por exemplo, o 2,4,5-T, ingrediente ativo no agente laranja, foi amplamente utilizado como desfolhante durante a guerra do Vietnã. Sua ação está baseada na capacidade de aumentar a síntese de etileno, estimulando, assim, a abscisão foliar.

Um modelo para o controle hormonal da abscisão foliar descreve o processo em três fases distintas e seqüenciais (Figura 22.11) (Reid, 1995):

(A) (B)

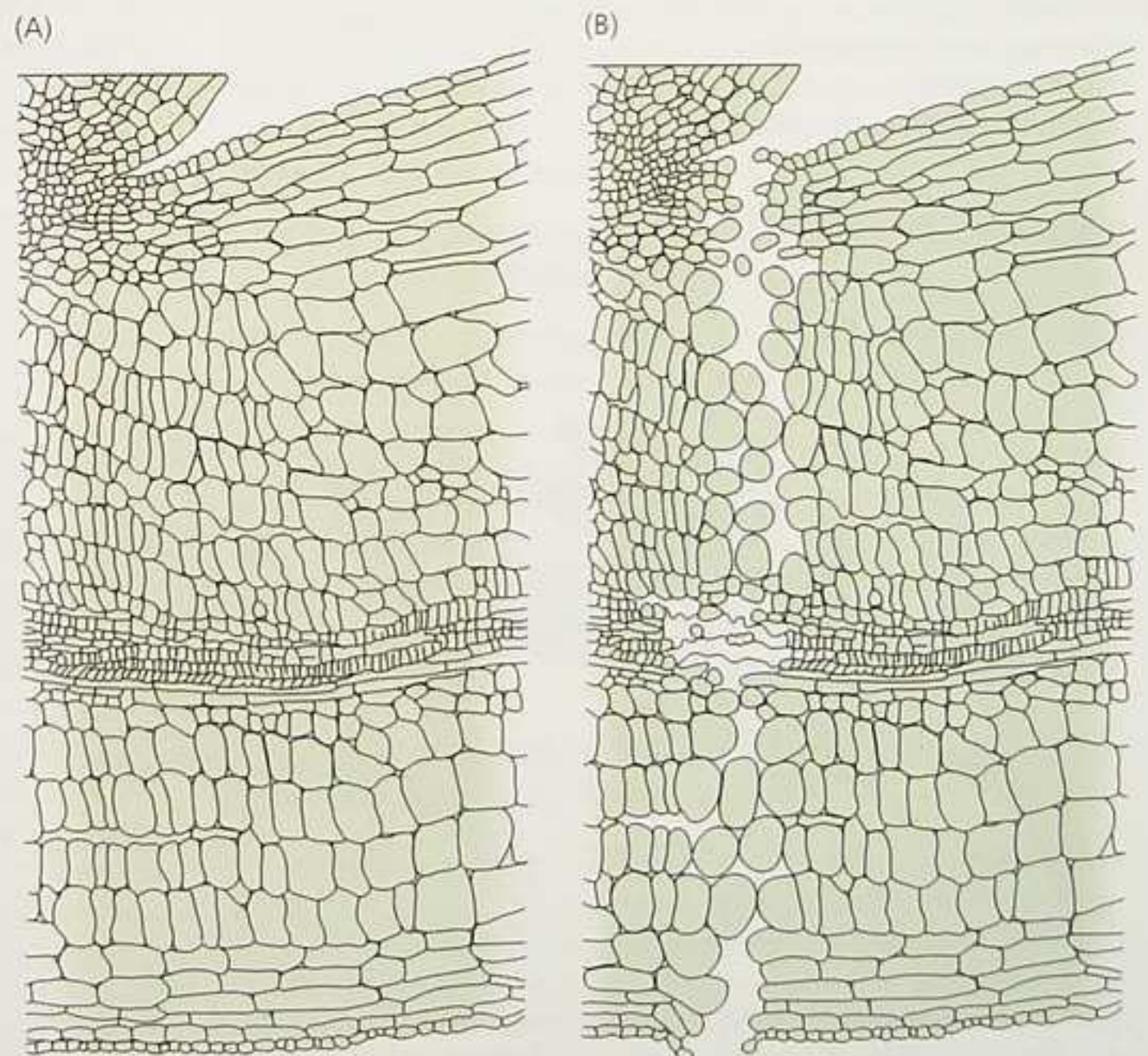



FIGURA 22.9 Durante a formação da camada de abscisão, neste caso formada em *Impatiens*, duas ou três fileiras de células na zona de abscisão (A) sofrem degradação da parede celular, devido a um aumento das enzimas que hidrolisam a parede (B). Os protoplastos resultantes arredondam-se e aumentam em volume, separando as células traqueais e facilitando a separação da folha do caule (Sexton e cols., 1984).

FIGURA 22.10 Efeito do etileno na abscisão de bétula (*Betula pendula*). A planta à esquerda é o tipo selvagem. A planta à direita foi transformada com a versão mutante do receptor de etileno de *Arabidopsis*, ETR1-1. A expressão deste gene estava sob controle transcricional de seu próprio promotor. Uma das características dessa árvore mutante é que elas não perdem as folhas quando fumegadas por três dias com 50 ppm de etileno.

1. *Fase de manutenção da folha.* Antes da percepção de qualquer sinal (interno ou externo), que inicie o processo de abscisão, a folha permanece sadia e completamente funcional na planta. Um gradiente de auxina da lâmina foliar para o caule mantém a zona de abscisão em um estado insensível.
2. *Fase de indução da queda.* Uma redução ou reversão no gradiente de auxina da folha, normalmente associado à senescência foliar, torna a zona de abscisão sensível ao etileno. Os tratamentos que aumentam a senescência foliar podem promover a abscisão por interferir na síntese e/ou transporte de auxina na folha.
3. *Fase de queda* As células sensibilizadas na zona de abscisão respondem a baixas concentrações de etileno endógeno sintetizando e secretando celulase e outras enzimas de degradação da parede celular, resultando na queda.

Durante a fase inicial de manutenção da folha, a auxina das folhas evita a abscisão, ao manter as células da zona de abscisão em um estado insensível ao etileno. É fato já conhecido que a remoção da lâmina foliar (o local de produção da auxina) promove a abscisão do pecíolo. A aplicação de auxina exógena ao pecíolo, do qual a lâmina foliar foi removida, retarda o processo de abscisão. Entretanto, a aplicação de auxina na região próxima a zona de abscisão (i. é, a região mais próxima do pecíolo) *acelera* efetivamente o processo de abscisão. Esses resultados indicam que não é a quantidade absoluta de auxina na zona de abscisão, mas o *gradiente* de auxina que controla a sensibilidade dessas células ao etileno.

Na fase de indução da queda, a quantidade de auxina de uma folha diminui e os níveis de etileno aumentam. O etileno parece diminuir a atividade da auxina tanto pela redução de sua síntese e transporte quanto pelo aumento de sua destruição. A redução na

FIGURA 22.11 Visão esquemática das funções da auxina e do etileno durante a abscisão foliar. Na fase de indução da queda, o nível de auxina diminui e o de etileno aumenta. Tais mudanças no balanço hormonais aumentam a sensibilidade das células-alvo ao etileno (Morgan, 1984).

concentração de auxina livre aumenta a resposta de células-alvo específicas ao etileno. A fase de queda é caracterizada pela indução de genes que codificam enzimas hidrolíticas específicas de polissacarídeos e proteínas da parede celular.

As *células-alvo*, localizadas na zona de abscisão, sintetizam celulase e outras enzimas que degradam polissacarídeos e as secretam na parede celular, por meio de vesículas secretoras derivadas do Golgi. A ação dessas enzimas leva ao afrouxamento da parede celular, à separação das células e à abscisão.

O etileno possui importantes usos comerciais

Visto que o etileno regula tantos processos fisiológicos de desenvolvimento vegetal, ele é um dos hormônios mais utilizados na agricultura. As auxinas e o ACC podem desencadear a síntese natural de etileno, sendo em diversos casos usadas na prática da agricultura. Devido à sua alta taxa de difusão, é muito difícil aplicar o etileno no campo sob forma de gás, mas tal limitação pode ser superada se um composto que libere o etileno for utilizado. O composto mais amplamente utilizado é o etefon, ou ácido 2-cloroetilfosfônico, descoberto na década de 1960 e conhecido por vários nomes comerciais, como etrel, por exemplo.

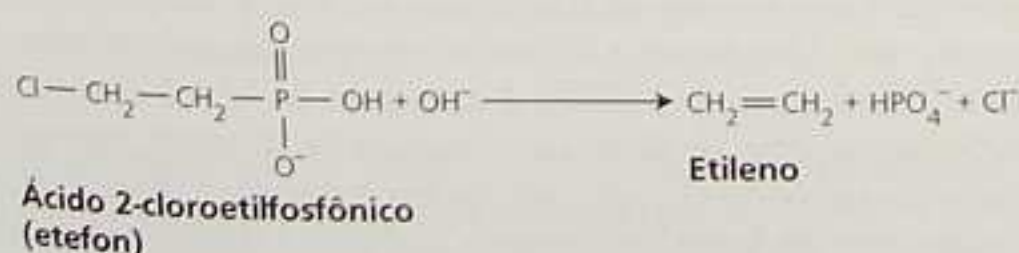
O etefon, aspergido em solução aquosa, é rapidamente absorvido e transportado no interior do vegetal. Ele libera lentamente o etileno por meio de uma reação química, permitindo que o hormônio exerça seus efeitos.

O etefon acelera o amadurecimento de frutos da macieira e do tomateiro e reduz a cor verde em citros, sincroniza a floração e o estabelecimento de frutos em plantas de abacaxi e acelera a abscisão de flores e frutos. Ele pode ser utilizado para induzir o raleio de frutos ou a queda de frutos no algodoeiro, na cerejeira e na nogueira. É utilizado também para promover a expressão do sexo feminino em pepino, impedindo a autopolinização e aumentando a produção, para inibir o crescimento terminal de algumas plantas, a fim de promover o crescimento lateral e compactar o pedúnculo floral.

Câmaras de estocagem desenvolvidas para inibir a produção de etileno e promover a preservação de frutos possuem uma atmosfera controlada de baixa concentração de O_2 e baixa temperatura, que inibe a biossíntese do etileno. Uma concentração relativamente alta de CO_2 (3 a 5%) impede a ação do etileno como promotor do amadurecimento. A baixa pressão (vácuo) é utilizada para remover o etileno e o oxigênio das câmaras de estocagem, reduzindo a taxa de amadurecimento e evitando o amadurecimento excessivo.

Os inibidores específicos da biossíntese e da ação de etileno também são úteis na preservação pós-colheita. A prata (Ag^+) é utilizada extensivamente para aumentar a longevidade de várias flores de corte, como o cravo. O AVG é um potente inibidor, que retarda o amadurecimento de frutos e a murcha de flores, mas seu uso comercial ainda não foi aprovado pelas agências oficiais. O odor forte e desagradável do *trans*ciclooctano impede o seu uso na agricultura.

$$Cl-CH_2-CH_2-\underset{O^-}{\overset{O}{\overset{\|}{\underset{|}{P}}}}-OH + OH^- \longrightarrow CH_2{=}CH_2 + HPO_4^- + Cl^-$$

Ácido 2-cloroetilfosfônico (etefon) — **Etileno**

Atualmente, o 1-metilciclopropano (MCP) está sendo desenvolvido para uso em várias aplicações de pós-colheita.

Em um futuro próximo poderá haver uma variedade de espécies de importância econômica, geneticamente modificadas quanto à biossíntese de etileno ou à sua percepção. A inibição do amadurecimento em tomate pela expressão de uma versão antisenso da ACC sintase e da ACC oxidase já foi mencionada. Um outro exemplo desta tecnologia é a petúnia, no qual a síntese de etileno foi bloqueada pela transformação com uma versão antisenso da ACC oxidase. Tanto a senescência quanto a murcha das pétalas das flores nessas plantas transgênicas são retardadas por semanas.

MODOS DE AÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO ETILENO

Apesar da ampla faixa de efeitos do etileno no desenvolvimento, supõe-se que as principais etapas de sua ação sejam semelhantes em todos os casos: todas elas envolvem a ligação ao receptor, seguida pela ativação de uma ou mais rotas de transdução de sinal (ver **Capítulo 14 na Internet**), induzindo uma resposta celular. Basicamente, o etileno apresenta seus efeitos principalmente pela alteração do padrão de expressão gênica. Há poucos anos, importantes progressos foram obtidos na compreensão da percepção ao etileno, a partir de estudos genéticos moleculares em *Arabidopsis thaliana*.

Uma chave na elucidação dos componentes da sinalização de etileno foi o uso da resposta morfológica tríplice de plântulas estioladas de *Arabidopsis* para identificar mutantes afetados em suas respostas a esse hormônio (ver Figura 22.7) (Guzman e Ecker, 1990). Duas classes de mutantes foram identificadas nos experimentos em que sementes de *Arabidopsis* tratadas com mutagênicos foram crescidas por três dias no escuro, em um meio com ágar, na presença ou ausência de etileno:

1. Mutantes que não responderam ao etileno exógeno (mutantes etileno-resistentes ou etileno-insensíveis).
2. Mutantes que apresentaram a resposta mesmo na ausência de etileno (mutantes constitutivos).

Os mutantes etileno-insensíveis são identificados como plântulas altas bem maiores do que as demais, que apresentam resposta tríplice quando crescem na presença de etileno. Inversamente, os mutantes de resposta constitutiva para o etileno são identificados como plântulas que apresentam a resposta tríplice na ausência de etileno exógeno.

Os receptores de etileno estão relacionados ao sistema de dois componentes da histidina quinase de bactéria

O primeiro mutante etileno-insensível foi o *etr1* (*etileno-resistente 1*) (Figura 22.12). O mutante *etr1* foi identificado em uma triagem de mutantes que bloqueiam a resposta de plântulas de *Arabidopsis* ao etileno. A seqüência de aminoácidos da porção carboxiterminal do *ETR1* é semelhante ao sistema de dois componentes da histidina quinase de bactéria — receptores utilizados pelas bactérias para perceberem vários estímulos ambientais, como estímulos quimiossensor, disponibilidade de fosfato e osmolaridade.

Os sistemas bacterianos de dois componentes consistem de um sensor histidina quinase e um regulador de resposta, que freqüentemente age como um fator de transcrição (ver **Capítulo 14**

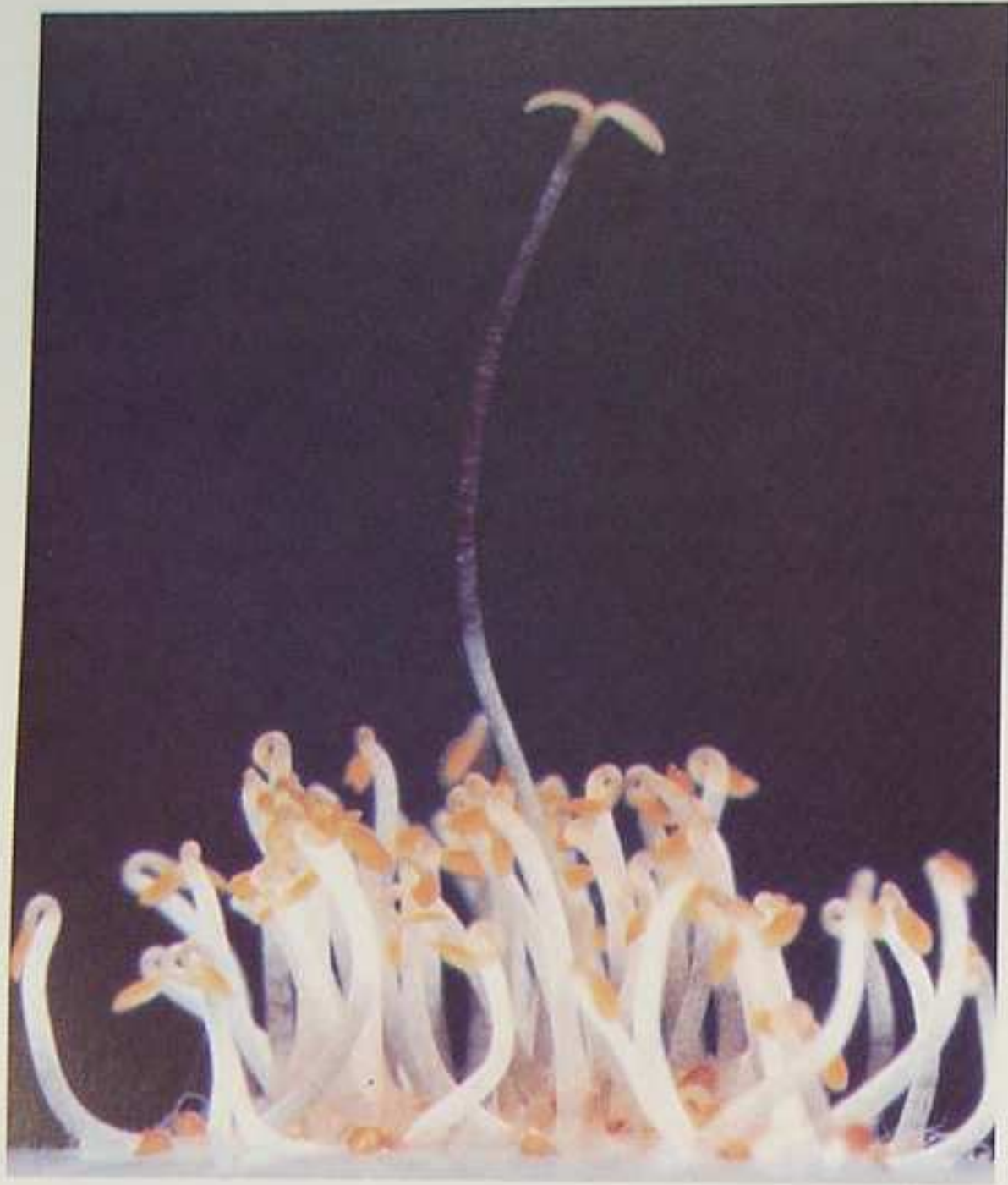



FIGURA 22.12 Triagem para o mutante *etr1* de *Arabidopsis*. As plântulas foram crescidas por três dias no escuro com etileno. Observe que exceto uma plântula, todas estão exibindo a resposta tríplice: aumento na curvatura do gancho plumular, inibição e expansão radial do hipocótilo, além de crescimento horizontal. O mutante *etr1* é completamente insensível ao hormônio e cresce como uma plântula não-tratada (fotografia de K. Stepnitz do MSU/DOE Plant Research Laboratory).

na Internet). O ETR1 foi o primeiro exemplo de histidina quinase em eucariontes, mas, desde então, outros foram descobertos em levedura, mamíferos e plantas. Tanto o receptor de fitocromo (ver Capítulo 17) quanto o de citocinina (ver Capítulo 21) também apresentam seqüências em comum com o sistema de dois componentes da histidina quinase de bactéria.

A semelhança com os receptores de bactérias e o mutante *etr1* etileno-insensível sugere que o ETR1 deve ser um receptor de etileno. Coerente com tal hipótese, a expressão do *ETR1* em levedura possibilitou que o etileno marcado radioativamente se ligasse com uma afinidade semelhante à curva de dose-resposta de plântulas de *Arabidopsis* e etileno (ver **Tópico 22.5 na Internet**).

O genoma de *Arabidopsis* codifica quatro proteínas adicionais semelhantes ao ETR1, que também funcionam como receptores de etileno: ETR2, ERS1 (*E*TR1-*r*elacionado à *s*eqüência *1*), ERS2 e EIN4 (Figura 22.13). Assim como no ETR1, esses receptores também se ligam ao etileno, sendo que mutações por substituição (do inglês, *missense*) nos genes que codificam essas proteínas, análogas à mutação *etr1* original, impedem a ligação do etileno ao receptor, mas permitem que o receptor funcione normalmente como um regulador da rota de resposta ao etileno na ausência do etileno.

Todas estas proteínas compartilham pelo menos dois domínios:

1. O domínio amino-terminal atravessa a membrana pelo menos três vezes e possui o sítio de ligação do etileno. O etileno pode rapidamente acessar esse sítio devido à sua hidrofobicidade.
2. A porção intermediária dos receptores de etileno possui um domínio catalítico de histidina quinase.

Um subgrupo de receptores de etileno também apresenta um domínio carboxiterminal, que é semelhante aos domínios receptores de dois componentes das bactérias. Em outros sistemas de dois componentes, a ligação do ligante regula a atividade do domínio histidina quinase, o qual autofosforila um resíduo de histidina conservado. O fosfato é, então, transferido para um resíduo de ácido aspártico localizado no domínio receptor. Embora a atividade da histidina quinase tenha sido demonstrada para um dos receptores de etileno — ETR1 — vários outros não apresentam aminoácidos críticos, tornando improvável que eles possuam atividade histidina quinase. Assim, o mecanismo bioquímico desses receptores de etileno é desconhecido.

Recentes estudos indicam que o ETR1 está localizado no *retículo endoplasmático*, e não na membrana plasmática como inicialmente suposto. Tal localização intracelular para o receptor de etileno é coerente com a natureza hidrofóbica do etileno, a qual permite a sua livre passagem através da membrana plasmática para o interior da célula. Nesse aspecto, o etileno é semelhante às moléculas hidrofóbicas de sinalização nos animais, tais como esteróides e o gás óxido nítrico, os quais também se ligam a receptores intracelulares.

A ligação de alta afinidade do etileno ao seu receptor necessita de cobre como co-fator

Mesmo antes da identificação de seu receptor, os cientistas presumiram que o etileno iria se ligar ao seu receptor via um metal de transição como co-fator, principalmente cobre ou zinco. Tal predição baseou-se na alta afinidade das olefinas, como o etileno, por estes metais de transição. Recentes estudos genéticos e bioquímicos têm corroborado essas predições.

A análise do receptor de etileno ETR1 expresso em levedura demonstrou que um íon cobre era ligado à proteína e que este íon era necessário para a ligação de alta afinidade com o etileno (Rodriguez e cols., 1999). O íon prata poderia substituir o cobre na formação da ligação de alta afinidade, indicando que a prata bloqueia a ação do etileno não por interferir na ligação do etileno, mas por impedir as alterações que normalmente ocorrem na proteína, quando o etileno liga-se ao receptor.

A evidência que a ligação do cobre é necessária para que o receptor de etileno funcione *in vivo* veio da identificação de um gene *RAN1* em *Arabidopsis* (Hirayama e cols., 1999). Fortes mutações em *ran1* bloqueiam a formação de receptores funcionais de etileno (Woeste e Kieber, 2000). A clonagem de *RAN1* revelou que ele codificava uma proteína semelhante à de levedura necessária para a transferência de um co-fator íon cobre para uma proteína de transporte de ferro. De maneira análoga, a RAN1 está provavelmente envolvida na adição de um co-fator íon cobre necessário para o funcionamento dos receptores de etileno.

Subfamília 1
Ligação do etileno
GAF
Histidina quinase
Receptor
ETR1 H D COOH
ERS1 H
Subfamília 2
Domínios histidina quinase degenerados
EIN4 H D
ETR2 D
ERS2

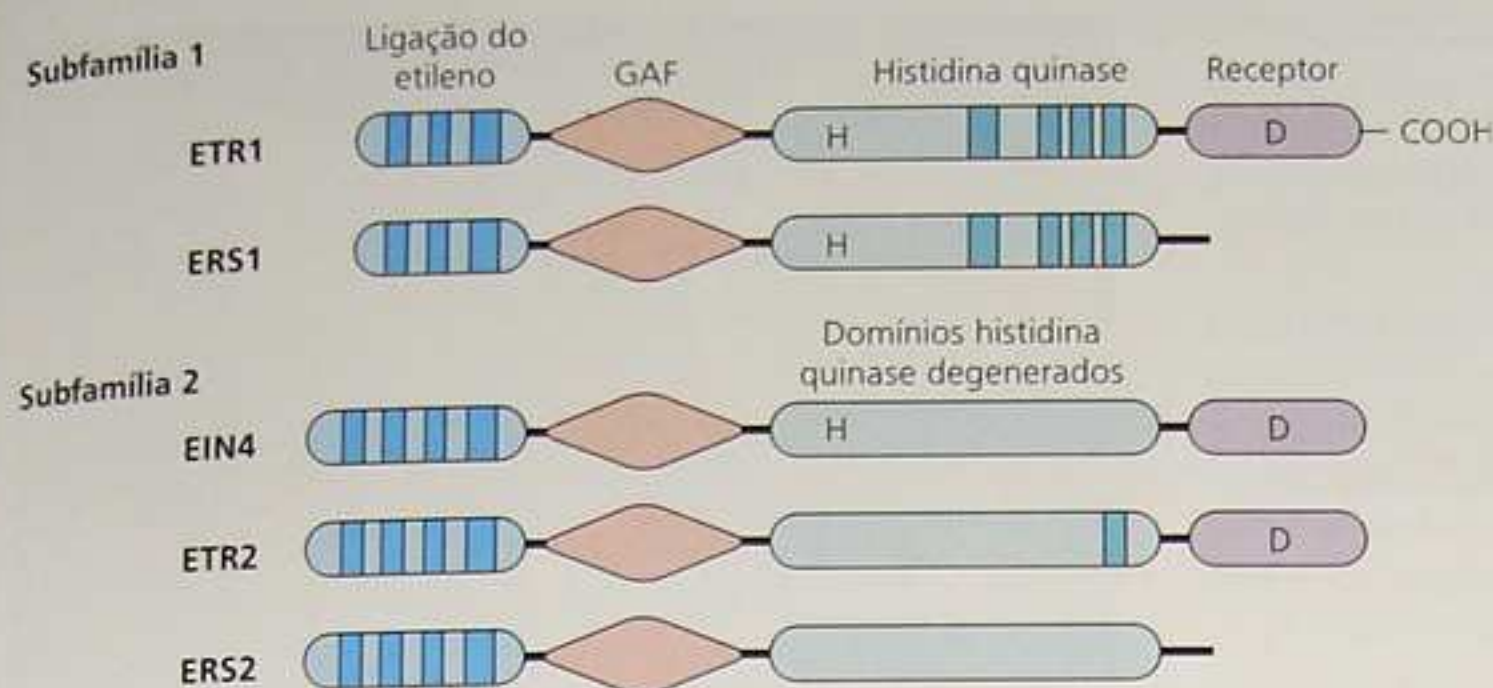



FIGURA 22.13 Diagrama esquemático de cinco proteínas receptoras de etileno e seus domínios funcionais. O GAF é um domínio conservado de ligação com o GMPc, encontrado em um grupo diverso de proteínas. Observe que EIN4, ETR2 e ERS2 apresentam domínios histidina quinase degenerados.

Receptores de etileno não-ligados são reguladores negativos na rota de resposta

Em *Arabidopsis*, tomateiro e provavelmente na maioria das outras espécies vegetais, os receptores de etileno são codificados por famílias multigênicas. A interrupção direcionada (inativação completa) dos cinco receptores de etileno de *Arabidopsis* (ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4) revelou que eles são funcionalmente redundantes (Hua e Meyerowitz, 1998). Isso significa que a interrupção de qualquer gene que codifica separadamente uma dessas proteínas não tem efeito, mas uma planta com interrupções em todos os cinco genes para receptor exibe um fenótipo de resposta constitutiva ao etileno (Figura 22.14D).

A observação de que as respostas ao etileno, como a resposta tríplice, tornam-se constitutivas quando os receptores estão interrompidos indica que os receptores estão normalmente "ligados" (i. é, no estado ativo) na *ausência* de etileno e que a função do receptor *sem* o seu ligante (etileno) é *desligar* a rota de sinalização que leva à resposta (Figura 22.14B). A ligação do etileno desliga os receptores, permitindo que a rota de resposta prossiga (Figura 22.14A).

Ao contrário do esperado, o modelo para receptores de etileno, no qual eles são reguladores negativos de uma rota de sinalização, é distinto do mecanismo da maioria dos receptores animal, os quais, após ligarem a seus ligantes, funcionam como reguladores positivos das suas respectivas rotas de transdução de sinal.

Em contraste com os receptores interrompidos, aqueles com mutações por substituição no sítio de ligação do etileno (como ocorre no mutante original *etr1*) são incapazes de se ligarem ao etileno, mas continuam ativos como reguladores negativos da rota de resposta ao etileno. Tais mutações resultam em uma planta que expressa um subgrupo de receptores que não podem mais ser desligados pelo etileno, conferindo, assim, um *fenótipo dominante etileno-insensível* (Figura 22.14C). Mesmo que os receptores normais possam ser desligados pelo etileno, os receptores mutantes continuam a sinalizar para a célula a supressão das respostas ao etileno, estando ele presente ou não.

Uma serina/treonina proteína quinase também está envolvida na sinalização de etileno

A mutação recessiva *ctr1* (*c*onstitutiva *t*ríplice *r*esposta *1* = resposta tríplice na ausência de etileno) foi identificada em triagens para mutações que constitutivamente ativavam respostas ao etileno (Figura 22.15). O fato de que a mutação causava uma *ativação* da resposta ao etileno sugere que a proteína do tipo selvagem também age como um *regulador negativo* de uma rota de resposta (Kieber e cols., 1993), semelhante aos receptores de etileno.

A CTR1 parece estar relacionada a RAF-1, uma MAPKKK serina/treonina proteína quinase (do inglês, *m*itogen-*a*ctivated *p*rotein *k*inase *k*inase *k*inase ou, em português, proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno), envolvida na transdução de vários sinais externos de regulação e das rotas de sinalização de desenvolvimento, em organismos que vão desde leveduras até humanos (ver **Capítulo 14 na Internet**). Em células animais, o produto final da cascata MAP quinase é um fator de transcrição fosforilado que regula a expressão gênica no núcleo.

EIN2 codifica uma proteína transmembrana

A mutação *ein2* (*e*tileno-*in*sensível *2*) bloqueia todas as respostas ao etileno, tanto em plântulas quanto em plantas adultas de *Arabidopsis*. O gene *EIN2* codifica uma proteína, que possui 12 domínios que se estendem através da membrana, muito semelhante à família N-RAMP (do inglês, *n*atural *r*esistence-*a*ssociated *m*acrophage *p*rotein ou, em português, proteína de resistência natural associada a macrófago) de transportadores de cátions em animais (Alonso e cols., 1999), sugerindo que ela possa agir como um canal ou poro. Até o momento, no entanto, os pesquisadores não têm tido sucesso em demonstrar uma atividade de transporte para esta proteína e a localização intracelular da proteína é desconhecida.

Curiosamente, as mutações no gene *EIN2* têm sido também identificadas nas triagens genéticas para outros hormônios, tais como ácido jasmônico e ABA, sugerindo que a EIN2 possa ser um intermediário comum nas rotas de transdução de sinais de vários hormônios e outros sinais químicos.

O etileno regula a expressão gênica

Um dos principais efeitos da sinalização de etileno é uma alteração na expressão de vários genes-alvo. O etileno afeta os níveis de mRNA transcrito de diversos genes, incluindo os que codificam a celulase, bem como aqueles relacionados ao amadurecimento e à síntese de etileno. Seqüências de regulação denominadas ele-

(A)

Etileno (C_2H_4)
A ligação do etileno inativa os receptores
Membrana plasmática
ETR1 ETR2 ERS1 ERS2 EIN4
Rota de resposta ao etileno
Ocorre a resposta ao etileno.

(B)

ETR1 ETR2 ERS1 ERS2 EIN4
Rota de resposta ao etileno
Na ausência do etileno, os receptores estão ativos e inibem a resposta ao etileno.

(C)

A ligação do etileno inativa os receptores
Etileno (C_2H_4)
Mutação por substituição no sítio de ligação torna o receptor insensível ao etileno.
ETR1 ETR2 ERS1 ERS2 EIN4
O receptor ativo inibe a resposta.
Rota de resposta ao etileno
A resposta não ocorre; o mutante exibe um fenótipo dominante negativo.

(D)

Interrupções nos domínios de regulação de múltiplos receptores de etileno (pelo menos três)
ETR1 ETR2 ERS1 ERS2 EIN4
Receptores interrompidos são inativos na presença e na ausência de etileno.
Rota de resposta ao etileno
Ocorre a resposta ao etileno.

FIGURA 22.14 Modelo para ação do receptor de etileno baseado no fenótipo de mutantes para receptor. (A) No tipo selvagem, a ligação do etileno inativa os receptores, permitindo que a resposta ocorra. (B) Na ausência de etileno, os receptores agem como reguladores negativos da rota de resposta. (C) Uma mutação por substituição, que interfere na ligação do etileno ao seu receptor, mas deixa o sítio de regulação ativo, resulta em um fenótipo dominante negativo. (D) Mutações de interrupção nos sítios reguladores resultam em uma resposta constitutiva ao etileno.

mentos de resposta ao etileno ou **EREs** têm sido identificadas a partir de genes regulados pelo etileno.

Os componentes-chave que fazem a intermediação dos efeitos do etileno na expressão gênica são os fatores de transcrição da família EIN3 (Chao e cols., 1997). Há pelo menos quatro genes tipo-*EIN3* em *Arabidopsis*, e homólogos foram identificados no tomateiro e no tabaco. Em resposta a um sinal de etileno, homodímeros de EIN3 ou seus parálogos (proteínas intimamente relacionadas) ligam-se ao promotor de um gene chamado *ERF1* (*fator 1 de resposta ao etileno*) e ativam sua transcrição (Solano e cols., 1998).

O *ERF1* codifica uma proteína pertencente à família de fatores de transcrição **proteína de ligação ERE** (**EREBP** do inglês, *ERE-binding protein*), as quais foram inicialmente identificadas em tabaco, como proteínas que se ligam às seqüências ERE (Ohme-Takagi e Shinshi, 1995). Várias EREBPs são rapidamente ativadas em resposta ao etileno. Os genes EREBP ocorrem em *Arabidopsis* como uma família gênica muito grande, porém somente poucos desses genes são induzidos pelo etileno.

A epistasia genética revela a ordem dos componentes de sinalização de etileno

A ordem de ação dos genes *ETR1*, *EIN2*, *EIN3* e *CTR1* foi determinada pela análise de como cada mutante interage com o outro (i. é, sua ordem epistática). Dois mutantes com fenótipos opostos são cruzados e uma linhagem contendo ambas as mutações (o duplo mutante) é identificada na geração F_2. No caso dos mutantes que respondem ao etileno, os pesquisadores construíram uma linhagem duplo mutante para o *ctr1*, uma mutação para resposta constitutiva ao etileno e a outra para etileno-insensível.

O fenótipo exibido pelo duplo mutante revela qual das mutações é epistática para a outra. Por exemplo, se um duplo mutante

FIGURA 22.15 Triagem de mutantes em *Arabidopsis* que exibem constitutivamente a resposta tríplice. As plântulas foram crescidas por três dias no escuro sem etileno. Evidencia-se uma plântula mutante *ctr1*, isolada entre as plântulas tipo selvagem mais altas (cedida por J. Kieber).

etr1/ctr1 exibe um fenótipo mutante para *ctr1*, a mutação *ctr1* é dita epistática para *etr1*. A partir disto, pode-se inferir que a CRT1 age *downstream* da ETR1 (Avery e Wasserman, 1992). Assim, a ordem de ação do ETR1, EIN2 e EIN3 foram determinados em relação a CTR1.

Conforme previsto, tem sido demonstrado que a proteína ETR1 interage fisicamente com o *downstream* da proteína CTR1, sugerindo que os receptores de etileno podem regular diretamente a atividade quinase da CTR1 (Clark e cols., 1998). O modelo da Figura 22.16 resume estas e outras informações. Genes semelhantes a vários desses genes sinalizadores de *Arabidopsis* foram descobertos em outras espécies (ver **Tópico 22.6 na Internet**).

O modelo ainda está incompleto devido à descoberta de outros mutantes que respondem ao etileno e que agem nesta rota. Além disso, está-se apenas começando a entender as propriedades bioquímicas dessas proteínas e como elas interagem. Contudo, está-se começando a vislumbrar o esboço das bases moleculares para a percepção e a transdução do sinal desse hormônio.

FIGURA 22.16 Modelo de sinalização de etileno em *Arabidopsis*. O etileno liga-se ao receptor ETR1, que é uma proteína integral da membrana do RE. Múltiplas isoformas dos receptores de etileno podem estar presentes em uma célula. Para facilitar a compreensão, somente o ETR1 está indicado. O receptor é um dímero unido por pontes dissulfeto. O etileno liga-se ao domínio transmembrana, por meio de um co-fator cobre, o qual é ligado ao receptor de etileno pela proteína RAN1.

RESUMO

O etileno é formado em muitos órgãos dos vegetais superiores. Tecidos senescentes e frutos em amadurecimento produzem mais etileno que tecidos jovens ou maduros. O precursor do etileno *in vivo* é o aminoácido metionina, o qual é convertido a AdoMet (*S*-adenosilmetionina), ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) e etileno. A etapa limitante dessa rota é a conversão do AdoMet em ACC, a qual é catalisada pela ACC sintase. A ACC sintase é codificada por membros de uma família de multigenes, os quais são diferencialmente regulados em vários tecidos vegetais e em resposta a diversos indutores da síntese do etileno.

A síntese de etileno é desencadeada por vários processos de desenvolvimento, pelas auxinas e pelo estresse ambiental. Em todos esses casos, o nível de atividade do mRNA da ACC sintase é aumentado. Os efeitos fisiológicos do etileno podem ser bloqueados por inibidores da biossíntese ou por antagonistas. O AVG (aminoetóxi-vinil-glicina) e AOA (ácido aminoxiacético) inibem a síntese de etileno; dióxido de carbono, prata, *trans*ciclooctano e MCP inibem a ação. O etileno pode ser detectado e medido por cromatografia gasosa.

O etileno regula o amadurecimento de frutos e outros processos associados com a senescência de flores e folhas, abscisão de frutos e flores, desenvolvimento de pêlos radiculares, crescimento de plântulas e a abertura do gancho plumular. O etileno também regula a expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados ao amadurecimento e aos patógenos.

O receptor de etileno é codificado por uma família de genes que codifica proteínas semelhantes às histidina quinases bacterianas de dois componentes. O etileno liga-se a esses receptores em um domínio transmembrana, através de um co-fator cobre. O componente da transdução *downstream* do sinal inclui CTR1, um membro da família RAF das proteínas quinases e EIN2, uma proteína transmembrana tipo canal. Essa rota ativa uma cascata de fatores de transcrição, incluindo as famílias EIN3 e EREBP, as quais modulam a expressão gênica.

Material da Internet

Tópicos da Internet

22.1 Clonagem da ACC sintase
Uma breve descrição da clonagem do gene da ACC sintase, utilizando anticorpos contra proteínas parcialmente purificadas.

22.2 Clonagem do gene da ACC oxidase
O gene da ACC oxidase foi clonado por via indireta, utilizando o DNA Anti-senso.

22.3 A biotecnologia e a expressão do gene da ACC sintase
A discussão do uso do gene da ACC sintase na biotecnologia.

22.4 A abscisão e o início da agricultura
Um curto ensaio sobre a domesticação dos cereais modernos, baseada na seleção artificial para a manutenção dos pedúnculos.

22.5 A ligação do etileno ao ETR1 e a resposta da plântula ao etileno
A ligação do etileno ao seu receptor ETR1 foi demonstrada pela primeira vez pela expressão do gene em levedura.

22.6 A manutenção do componente de sinalização de etileno em outras espécies vegetais
Evidências sugerem que a sinalização de etileno é semelhante em todas as espécies vegetais.

Referências bibliográficas

Abeles, F. B., Morgan, P W., and Saltveit, M. E., Jr. (1992) *Ethylene in Plant Biology*, 2nd ed. Academic Press, San Diego.

Alonso, J. M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J. R. (1999) EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* 284: 2148-2152.

Avery L., and Wasserman, S. (1992) Ordering gene function: The interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. *Trends Genet.* 8: 312-316.

Bradford, K. J., and Yang, S. E (1980) Xylem transport of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, an ethylene precursor, in waterlogged tomato plants. *Plant Physiol.* 65: 322-326.

Burg, S. P, and Burg, E. A. (1965) Relationship between ethylene production and ripening in bananas. *Bot. Gaz.* 126: 200-204.

Burg, S. P, and Thimann, K. V (1959) The physiology of ethylene formation in apples. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 45: 335-344.

Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghu, W, and Ecker, J. R. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89:1133-1144.

Clark, K. L., Larsen, P B., Wang, X., and Chang, C. (1998) Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5401-5406.

Dolan, L., Duckett, C. M., Grierson, C., Linstead, P., Schneider, K., Lawson, E., Dean, C., Poethig, S., and Roberts, K. (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120: 2465-2474.

Gray J. E., Picton, S., Giovannoni, J. J., and Grierson, D. (1994) The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell Environ.* 17: 557-571.

Grbic, V, and Bleecker, A. B. (1995) Ethylene regulates the timing of leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 8: 595-602.

Guzman, P., and Ecker, J. R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513-523.

Hensel, L. L., Grbic, V, Baumgarten, D. A., and Bleecker, A. B. (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5: 553-564.

Hirayama, T., Kieber, J. J., Hirayama, N., Kogan, M., Guzman, P, Nourizadeh, S., Alonso, J. M., Dailey, W. P, Dancis, A., and Ecker, J. R. (1999) *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1*, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis. *Cell* 97:383-393.

Hoffman, N. E., and Yang, S. F. (1980) Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105: 492-495.

Hua, J., and Meyerowitz, E. M. (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94:261-271.

Kieber, J. J., Rothenburg, M., Roman, G., Feldmann, K. A., and Ecker, J. R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427-441.

Lanahan, M., Yen, H.-C., Giovannoni, J., and Klee, H. (1994) The *Never-ripe* mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell* 6:427-441.

Lehman, A., Black, R., and Ecker, J. R. (1996) *Hookless1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hook. *Cell* 85:183-194.

Liang, X., Abel, S., Keller, J., Shen, N., and Theologis, A. (1992) The 1-aninocyclopropane-l-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11046-11050.

McKeon, T. A., Fernandez-Maculet, J. C., and Yang, S. F. (1995) Biosynthesis and metabolism of ethylene. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp.118-139.

Morgan, P W. (1984) Is ethylene the natural regulator of abscission? In *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*, Y Fuchs and E. Chalutz, eds., Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands, pp.231-240.

Nakagawa, J. H., Mori, H., Yamazaki, K., and Imaseki, H. (1991) Cloning of the complementary DNA for auxin-induced 1aminocyclopropane-l-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding. *Plant Cell Physiol.* 32:1153-1163.

Oeller, P, Min-Wong, L., Taylor, L., Pike, D., and Theologis, A. (1991) Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-139.

Ohme-Takagi, M., and Shinshi, H. (1995) Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 7: 173-182.

Olson, D. C., White, J. A., Edelman, L., Harkins, R. N., and Kende, H. (1991) Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:5340-5344.

Perovic, S., Seack, J., Gamulin, V, Miiller, W E. G., and Schroder, H. C. (2001) Modulation of intracellular calcium and proliferative activity of invertebrate and vertebrate cells by ethylene. *BMC Cell Biol.* 2: 7.

Raskin, I., and Beyer, E. M., Jr. (1989) Role of ethylene metabolism in *Amaranthus retrof exus*. *Plant Physiol.* 90: 1-5.

Reid, M. S. (1995) Ethylene in plant growth, development and senescence. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 486-508.

Rodriguez, E I., Esch, J. J., Hall, A. E., Binder, B. M., Schaller, E. G., and Bleecker, A. B. (1999) A copper cofactor for the ethylene receptor ETRl from *Arabidopsis*. *Science* 283: 396-398.

Sexton, R., Burdon, J. N., Reid, J. S. G., Durbin, M. L., and Lewis, L. N. (1984) Cell wall breakdown and abscission. In *Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Walls*, W. M. Dugger and S. Bartnicki-Garcia, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 383-406.

Sisler, E. C., and Serek, M. (1997) Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: Recent developments. *Physiol. Plant.* 100: 577-582.

Sisler, E., Blankenship, S., and Guest, M. (1990) Competition of cyclooctenes and cyclooctadienes for ethylene binding and activity in plants. *Plant Growth Regul.* 9:157-164.

Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J. R. (1998) Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Gene Dev.* 12:3703-3714.

Tanimoto, M., Roberts, K., and Dolan, L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 8: 943-948.

Tatsuki, M., and Mori, H. (2001) Phosphorylation of tomato 1-aminocyclopropane-l-carboxylic acid synthase, LE-ACS2, at the C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 276: 28051-28057.

Voesenek, L. A. C. J., Banga, M., Rijnders, J. H. G. M., Visser, E. J. W, Harren, E J. M., Brailsford, R. W, Jackson, M. B., and Blom, C. W P M. (1997) Laser-driven photoacoustic spectroscopy: What we can do with it in flooding research. *Ann. Bot.* 79: 57-65.

Vogel, J. E, Schuerman, E, Woeste, K., Brandstatter,1. Kieber, J. J. (1998) Isolation and characterization of *Arapidopsis* mutants defective in the induction of ethylene biosynthesis by cytokinin. *Genetics* 149: 417-127.

Woeste, K., and Kieber, J. J. (2000) A strong loss-of-function allele of *RANT* results in constitutive activation of ethylene responses as well as a rosette-lethal phenotype. *Plant Cell* 12:443-455.

Yang, S. E (1987) The role of ethylene and ethylene synthesis in fruit ripening. In *Plant Senescence: Its Biochemistry and Physiology*, W W Thomson, E. A. Nothnagel, and R. C. Huffaker, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 156-166.

Yuan, M., Shaw, E J., Warn, R. M., and Lloyd, C. W (1994) Dynamic reorientation of cortical microtubules, from transverse to longitudinal, in living plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6050-6053.

Zacarias, L., and Reid, M. S. (1990) Role of growth regulators in the senescence of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol. Plant.* 80: 549-554.

Capítulo

23 *Ácido abscísico: um sinal para a maturação de semente e antiestresse*

A EXTENSÃO E A PERIODICIDADE DO CRESCIMENTO VEGETAL são controladas por ações ordenadas de reguladores positivos e negativos. Alguns dos exemplos mais óbvios da regulação para o não-crescimento é a dormência de sementes e de gemas, característica adaptativa que retarda o crescimento até que as condições ambientais sejam favoráveis. Por muitos anos, os fisiologistas vegetais suspeitaram que o fenômeno da dormência de sementes e de gemas fosse causado por compostos inibidores, e tentaram com grandes esforços extrair e isolar tais compostos a partir de uma variedade de tecidos vegetais, em especial de gemas dormentes.

As primeiras pesquisas utilizaram cromatografia em papel para separar os extratos vegetais e os bioensaios baseados no crescimento de coleóptilos de aveia. Esses experimentos iniciais levaram à identificação de um grupo de compostos inibidores de crescimento, incluindo uma substância conhecida como *dormina*, purificada a partir de folhas do falso-plátano coletadas no início do outono, quando as árvores entram em dormência. Uma vez descoberto que a dormina era quimicamente idêntica a uma substância que promovia a abscisão de frutos do algodoeiro, a *abscisina II*, o composto foi renomeado como **ácido abscísico (ABA)** (ver Figura 23.1), para representar seu suposto envolvimento no processo de abscisão.

Hoje sabe-se que o etileno é o hormônio que desencadeia a abscisão e que o ABA induz a abscisão de frutos do algodoeiro por sua capacidade de estimular a produção de etileno. Conforme será aqui analisado, o ácido abscísico é atualmente considerado um hormônio vegetal importante pelo seu próprio mérito. Ele inibe o crescimento e a abertura estomática, em especial quando a planta esta sob estresse ambiental. Uma outra função importante é regular a maturação e a dormência de sementes. Em retrospecto, a *dormina* poderia ser o nome mais apropriado para este hormônio, contudo a denominação *ácido abscísico* é tradicionalmente utilizado na literatura.

OCORRÊNCIA, ESTRUTURA QUÍMICA E MEDIÇÃO DO ABA

O ácido abscísico é o hormônio vegetal encontrado em todas as plantas vasculares. Foi também detectado nos musgos, mas parece estar ausente nas hepáticas (ver **Tópico 23.1 na Internet**). Vários gêneros de fungos produzem o

(*S*)-*cis*-ABA (forma ativa que ocorre naturalmente)

(*R*)-*cis*-ABA (inativa no fechamento estomático)

(*S*)-2-*trans*-ABA (inativa, mas interconversível com forma ativa [*cis*])

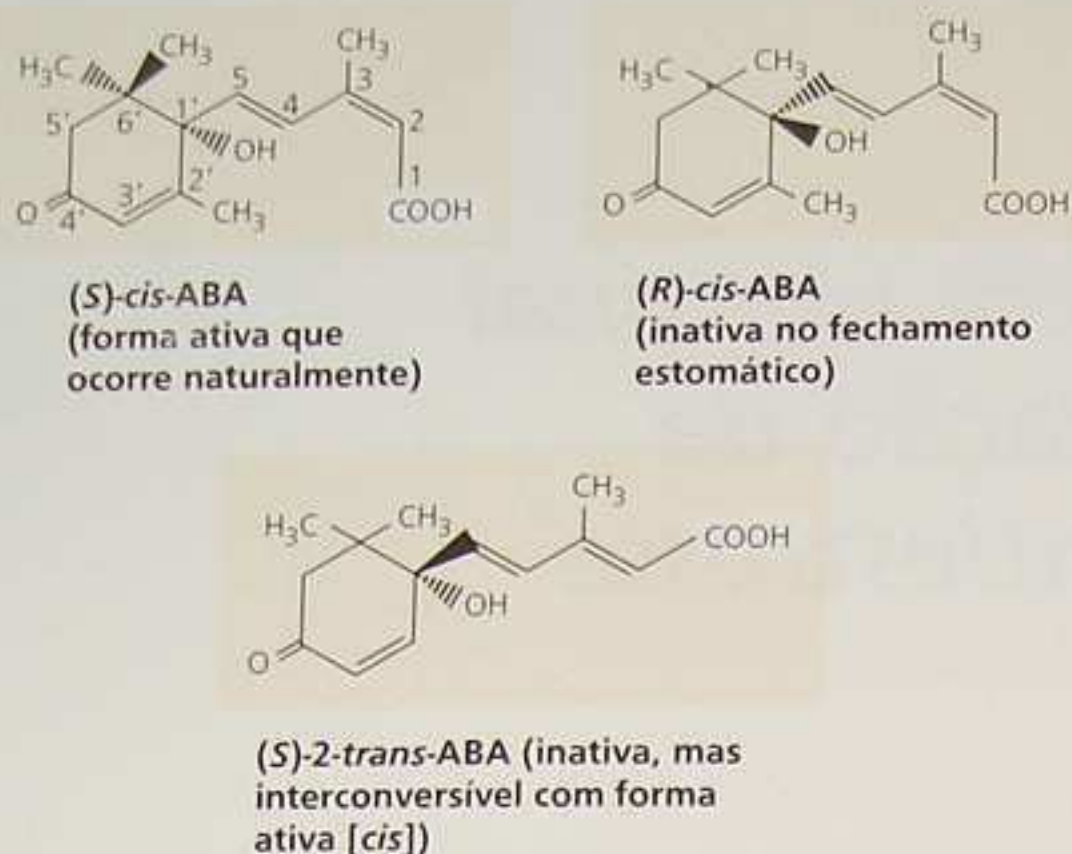



FIGURA 23.1 As estruturas químicas das formas *S* (sentido contrário ao movimento dos ponteiros do relógio) e *R* (sentido do movimento dos ponteiros do relógio) da forma *cis*-ABA e a forma (*S*)-2-*trans* do ABA. Os números no diagrama do (*S*)-*cis*-ABA identificam os átomos de carbono.

ABA como metabólito secundário (Milborrow, 2001). Nas plantas, ele tem sido detectado na maioria dos orgãos ou tecidos vivos, desde a coifa até a gema apical. O ABA é sintetizado em quase todas as células que possuem cloroplastos ou amiloplastos.

A estrutura química do ABA determina a sua atividade fisiológica

O ABA é um composto de 15 carbonos semelhante à porção terminal de algumas moléculas de carotenóide (Figura 23.1). A orientação do grupo carboxila no carbono 2 determina os isômeros *cis* e *trans* do ABA. Aproximadamente todos os ABAs que ocorrem naturalmente estão na forma *cis*, e, por convenção, a denominação de *ácido abscísico* refere-se a esse isômero.

O ABA também possui um átomo de carbono assimétrico na posição 1′ do anel, resultando nos enantiômeros *S* e *R* (ou + e —, respectivamente). O enantiômero *S* é a forma natural; o ABA sintético disponível comercialmente é a mistura de quantidades aproximadamente iguais das formas *S* e *R*. O enantiômero *S* é o único que é ativo nas respostas rápidas ao ABA, como o fechamento estomático. Em respostas mais longas, como na maturação da semente, ambos os enantiômeiros são ativos. Ao contrário dos isômeros *cis* e *trans*, as formas *S* e *R* não podem ser interconvertidas no tecido vegetal.

Os estudos das exigências estruturais para a atividade biológica do ABA têm mostrado que praticamente qualquer mudança na molécula resulta na perda da atividade (ver Tópico 23.2 na Internet).

O ABA é analisado por métodos biológicos, físicos e químicos

Vários bioensaios têm sido utilizados para o ABA, incluindo a inibição do crescimento de coleóptilo, a germinação ou a síntese da α-amilase induzida pelo GA. Por outro lado, a indução do fechamento estomático e da expressão gênica constituem exemplos de respostas indutivas rápidas (ver Tópico 23.3 na Internet).

Os métodos físicos de detecção do ABA são muito mais confiáveis do que os bioensaio, devido à sua especificidade e à sua adequação para análises quantitativas. As técnicas mais utilizadas atualmente baseiam-se na cromatografia gasosa ou na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, do inglês HPLC, *high-performance liquid chromatography*). A cromatografia gasosa permite a detecção de concentrações tão baixas quanto 10^{-13} g de ABA, porém necessita de várias etapas preliminares de purificação, incluindo a cromatografia de camada delgada. Os imunoensaios são também altamente sensíveis e específicos.

BIOSSÍNTESE, METABOLISMO E TRANSPORTE DO ABA

Assim como nos outros hormônios, a resposta do ABA depende da sua concentração no tecido e na sensibilidade do tecido ao hormônio. Os processos de biossíntese, catabolismo, compartimentação e transporte, contribuem para a concentração do hormônio ativo no tecido, em qualquer estágio de desenvolvimento. A via biossintética completa do ABA foi elucidada com o auxílio de mutantes ABA-deficientes que bloqueiam etapas específicas da via.

O ABA é sintetizado a partir de um carotenóide intermediário

A biossíntese do ABA ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos pela via representada na Figura 23.2. Vários mutantes ABA-deficientes apresentando falhas em etapas específicas da via têm sido identificados. Esses mutantes exibem fenótipos anormais, que podem ser corrigidos pela aplicação de ABA exógeno. Por exemplo, *flacca* (*flc*) e *sitiens* (*sit*) são *mutantes wilty* de tomateiro, nos quais a tendência de murcha das folhas (devido à incapacidade de fechar seus estômatos), pode ser evitada pela aplicação de ABA exógeno. Os mutantes *aba* de *Arabidopsis* também apresentam um fenótipo murcho. Esses e outros mutantes têm sido úteis na elucidação dos detalhes da via (Milborrow, 2001).

A via inicia com o isopentenildifosfato (IPP), a unidade isoprênica biológica, e leva à síntese da xantofila C_{40} (i. é, um carotenóide oxigenado) **violaxantina** (ver Figura 23.2). A síntese da violaxantina é catalisada pela zeaxantina epoxidase (ZEP), a enzima codificada pelo lócus *ABA1* de *Arabidopsis*. Essa descoberta forneceu evidências conclusivas de que a síntese do ABA ocorre preferencialmente por via "indireta" ou via de carotenóides, mais do que como uma pequena molécula. Os mutantes de milho (*vp*) que são bloqueados em outras etapas da via dos carotenóides, possuem também níveis reduzidos de ABA e apresentam **viviparidade** — germinação precoce das sementes no fruto enquanto ainda ligado à planta (Figura 23.3). A viviparidade é uma característica de muitas sementes ABA-deficientes.

A violaxantina é convertida a um composto C_{40}, **9′-*cis*-neoxantina**, o qual é, então, clivado para formar o composto C_{15}, **xantoxal**, inicialmente chamado de *xantoxin*, um inibidor de crescimento neutro que apresenta propriedades fisiológicas semelhantes àquelas do ABA. A clivagem é catalisada pela **9-*cis*-epóxicarotenóide dioxigenase** (NCED), assim chamada porque pode clivar tanto o 9-*cis*-violaxantina quanto o 9′-*cis*-neoxantina.

OPP
Isopentenildifosfato (IPP)

OPP
A ligação do componente farnesil às proteínas específicas faz com que elas se liguem à membrana.
Farnesildifosfato (C_{15})

vp2, vp5, vp7, vp9: Mutantes de milho

OH
HO
Zeaxantina (C_{40})

ZEP | *aba1:* Mutante de *Arabidopsis*

OH
O
O
HO
Todos *trans*-Violaxantina (C_{40})

Sítio de clivagem
HO
OH
O
HO
9'-*cis*-Neoxantina (C_{40})

O_2
NCED | *Vp14:* Mutante de milho

O
HO
CHO
Xantoxal (C_{15})
Inibidores de crescimento

OH
O
CHO
ABA-aldeído (C_{15})

flacca, sitiens: Mutantes de tomate
droopy: Mutantes de batata
aba3: Mutante de *Arabidopsis*
nar2a: Mutante de cevada

Inativação do ABA por oxidação

Inativação do ABA por conjugação com monossacarídeos

H
O
OH
OH
COOH
Ácido 4'-diidrofaséico (DPA)

O
OH
O
COOH
Ácido faséico (PA)

Oxidação

OH
O
COOH
Ácido abscísico (C_{15}) (ABA)

Conjugação

OH
O
C—O
O
CH_2OH
OH
OH
OH
ABA-β-D-glicose éster

FIGURA 23.2 Biossíntese e metabolismo do ABA. Nas plantas superiores, o ABA é sintetizado pela via dos terpenóides (ver Capítulo 13). Alguns mutantes ABA-deficientes, que tem sido úteis na elucidação da rota, estão indicados nas etapas onde são bloqueados. As vias para o catabolismo do ABA incluem conjugação para formar ABA-β-D-glicosil éster ou oxidação para formar ácido faséico e então o ácido diidrofaséico. ZEP = Zeaxantina epoxidase; NCED= 9-*cis*-epóxi-carotenóides dioxigenase.

FIGURA 23.3 Germinação precoce do mutante de milho *vp14* ABA-deficiente. A proteína VP14 catalisa a clivagem dos 9-*cis*-epóxi-carotenóides para formar xantoxal, um precursor do ABA (cortesia de Bao Cai Tan e Don McCarty).

A síntese da NCED é rapidamente induzida pelo estresse hídrico, sugerindo que a reação que ela catalisa é uma etapa-chave de regulação na síntese do ABA. Essa enzima localiza-se nos tilacóides, onde o substrato carotenóide ocorre. Por último, o xantoxal é convertido a ABA por meio de etapas oxidativas, envolvendo o(s) intermediário(s) **ABA-aldeído** e/ou possivelmente ácido xantóxico. Essa etapa final é catalisada por uma família de aldeído oxidases que necessitam de um co-fator molibdênio; os mutantes *aba3* de *Arabidopsis* não apresentam um cofator molibdênio funcional e são, portanto, incapazes de sintetizar ABA.

As concentrações do ABA são altamente variáveis nos tecidos

A biossíntese e as concentrações de ABA podem variar muito em tecidos específicos durante o desenvolvimento ou em resposta às mudanças das condições ambientais. Nas sementes em desenvolvimento, por exemplo, os níveis de ABA podem aumentar 100 vezes em poucos dias e então declinar a níveis muito baixos à medida que a maturação prossegue. Sob condições de estresse hídrico, o ABA nas folhas pode aumentar em 50 vezes dentro de quatro a oito horas. Uma vez irrigadas, o nível do ABA retorna ao normal no mesmo período de tempo.

A biossíntese não é o único fator que regula as concentrações de ABA nos tecidos. Assim como em outros hormônios vegetais, a concentração de ABA livre no citosol é também regulada pela degradação, compartimentação, conjugação e transporte. Por exemplo, o ABA citosólico aumenta durante o estresse hídrico como resultado de sua síntese nas folhas, redistribuição nas células do mesofilo, importação das raízes e movimentação a partir de outras folhas. A concentração de ABA diminui após a irrigação devido à sua degradação e exportação das folhas, bem como ao decréscimo da taxa de síntese.

O ABA pode ser inativado por oxidação ou por conjugação

A maior causa da inativação do ABA livre é a oxidação, produzindo o 6-hidroximetil ABA, um intermediário instável, o qual é rapidamente convertido a **ácido faséico (PA)** e **ácido diidrofaséico (DPA)** (ver Figura 23.2). Em geral o PA é inativo ou possui atividade muito reduzida em bioensaios. Entretanto, o PA pode induzir o fechamento estomático em algumas espécies e é tão ativo quanto o ABA na inibição da produção da α-amilase induzida pelo GA, na camada de aleurona da aveia. Esses efeitos sugerem que o PA é capaz de se ligar a receptores do ABA. Ao contrário do PA, o DPA não apresenta atividade detectável em qualquer um dos bioensaios realizados.

O ABA livre é também inativado por conjugação covalente com outras moléculas, com um monossacarídeo. Um exemplo geral de conjugação do ABA é o **ABA-β-D-glicosil éster (ABA-GE)**. A conjugação não apenas resulta na inativação do ABA como hormônio; ela também altera a sua polaridade e a distribuição celular. Enquanto que o ABA livre está localizado no citosol, o ABA-GE acumula-se nos vacúolos e, assim, poderia, teoricamente, servir como uma forma de armazenamento desse hormônio.

As enzimas esterases das células vegetais, poderiam liberar o ABA da forma conjugada. Entretanto, não há evidência de que a hidrólise do ABA-GE contribua para o rápido aumento do ABA na folha durante o estresse hídrico. Quando plantas foram submetidas a uma série de ciclos de estresse hídrico e reirrigação, a concentração do ABA-GE aumentou uniformemente, sugerindo que a forma conjugada não é degradada durante esse tipo de estresse.

O ABA é translocado no tecido vascular

O ABA é transportado tanto no xilema quanto no floema, mas ele é, via de regra, mais abundante na seiva floemática. Quando o ABA radioativo é aplicado em uma folha, ele é transportado tanto de forma ascendente no caule quanto descendente nas raízes. A maior parte do ABA radioativo é encontrada nas raízes dentro de 24 horas. A destruição do floema pelo anelamento do caule inibe o acúmulo do ABA nas raízes, indicando que esse hormônio é transportado pelo floema.

O ABA sintetizado nas raízes pode também ser transportado para a parte aérea através do xilema. Enquanto que a concentração do ABA na seiva xilemática de plantas de girassol bem hidratadas está entre 1,0 e 15,0 n*M*, plantas de girassol sob estresse hídrico elevam a concentração do ABA em até 3.000 n*M* (3,0 μ*M*) (Schurr e cols., 1992). A magnitude da alteração dos níveis do ABA no xilema induzido pelo estresse varia muito entre as espécies, sendo sugerido que o ABA também seja transportado na forma conjugada e liberado por hidrólise nas folhas. Contudo, essa suposta hidrolase ainda necessita ser identificada.

Quando o estresse hídrico inicia, uma parte do ABA sintetizado nas raízes é carregado pela corrente xilemática, a partir das raízes que estão em contato direto com o solo seco. Já que o transporte do ABA ocorre antes que a redução do potencial hídrico do solo possa causar alguma mudança mensurável na condição de água das folhas, acredita-se que o ABA atue como um sinal da raiz, promovendo a redução da taxa de transpiração da planta pelo fechamento estomático (Davies e Zhang, 1991).

Embora a concentração de 3,0 μ*M* do ABA no apoplasto seja suficiente para fechar os estômatos, nem todo o ABA da corrente

xilemática atinge as células-guarda. Muito do ABA da corrente de transpiração é absorvido e metabolizado pelas células do mesofilo. Todavia, durante as fases iniciais do estresse hídrico, o pH da seiva xilemática torna-se mais alcalino, aumentando aproximadamente do pH 6,3 para o pH 7,2 (Wilkinson e Davies, 1997).

O controle principal da distribuição do ABA entre os compartimentos das células vegetais segue um conceito de "armadilha de ânions": a forma dissociada (ânion) deste ácido fraco acumula-se em compartimentos alcalinos e pode ser redistribuído de acordo com o gradiente de pH através da membrana. Além da compartimentação decorrente do pH, os transportadores específicos para absorção contribuem para a manutenção de uma concentração baixa do ABA no apoplasto das plantas não-estressadas.

A alcalinização do apoplasto induzida pelo estresse favorece a produção da forma dissociada do ácido abscísico, ABA^-, a qual não atravessa facilmente a membrana. Conseqüentemente, menos ABA entra nas células do mesofilo e mais moléculas atingem as células guardas através da corrente de transpiração (Figura 23.4). Observe que o ABA é redistribuído na folha sem que a sua quantidade total seja aumentada. Este aumento no pH da seiva do xilema pode funcionar como um sinal das raízes promovendo o início do fechamento estomático.

EFEITOS DO ABA NA FISIOLOGIA E NO DESENVOLVIMENTO

O principal papel do ácido abscísico é controlar o início e a manutenção da dormência de sementes e de gemas e as respostas do vegetal ao estresse, em particular ao estresse hídrico. Além disso, o ABA pode influenciar outros aspectos do desenvolvimento vegetal por interagir, geralmente como um antagonista, com auxina, a citocinina, a giberelina, o etileno e os brassinosteróides. Nesta seção serão apresentados os diversos efeitos fisiológicos do ABA, iniciando com o seu papel no desenvolvimento de sementes.

O ABA atinge níveis máximos nas sementes durante a embriogênese

O desenvolvimento das sementes pode ser dividido em três fases com duração aproximadamente igual:

1. Durante a primeira fase, a qual é caracterizada pela divisão celular e diferenciação dos tecidos, o zigoto sofre embriogênese e o tecido do endosperma se prolifera.
2. Durante a segunda fase, as divisões celulares cessam e compostos de armazenamento são acumulados.
3. Na fase final, o embrião torna-se tolerante à dessecação e a semente desidrata, perdendo mais de 90% de água. Como conseqüência da desidratação, o metabolismo cessa e a semente entra em um estádio **quiescente** ("latência"). Ao contrário das sementes dormentes, as sementes quiescentes irão germinar após serem reidratadas.

As duas últimas fases resultam na produção de sementes viáveis e com recursos adequados para sustentar a germinação, bem como a capacidade para retardar a germinação por semanas e até anos antes de reiniciar o crescimento. Normalmente, o conteúdo de ABA é muito baixo no início da embriogênese, atingindo os níveis mais elevados na fase intermediária desse processo e, então, diminui gradualmente reduzindo os níveis até a semente atingir a maturidade. Assim, existe um grande pico de acúmulo do ABA na semente, correspondendo ao período entre as fases intermediária e tardia da embriogênese.

O balanço hormonal das sementes é complexo devido ao fato de que nem todos os tecidos possuem o mesmo genótipo. A testa é

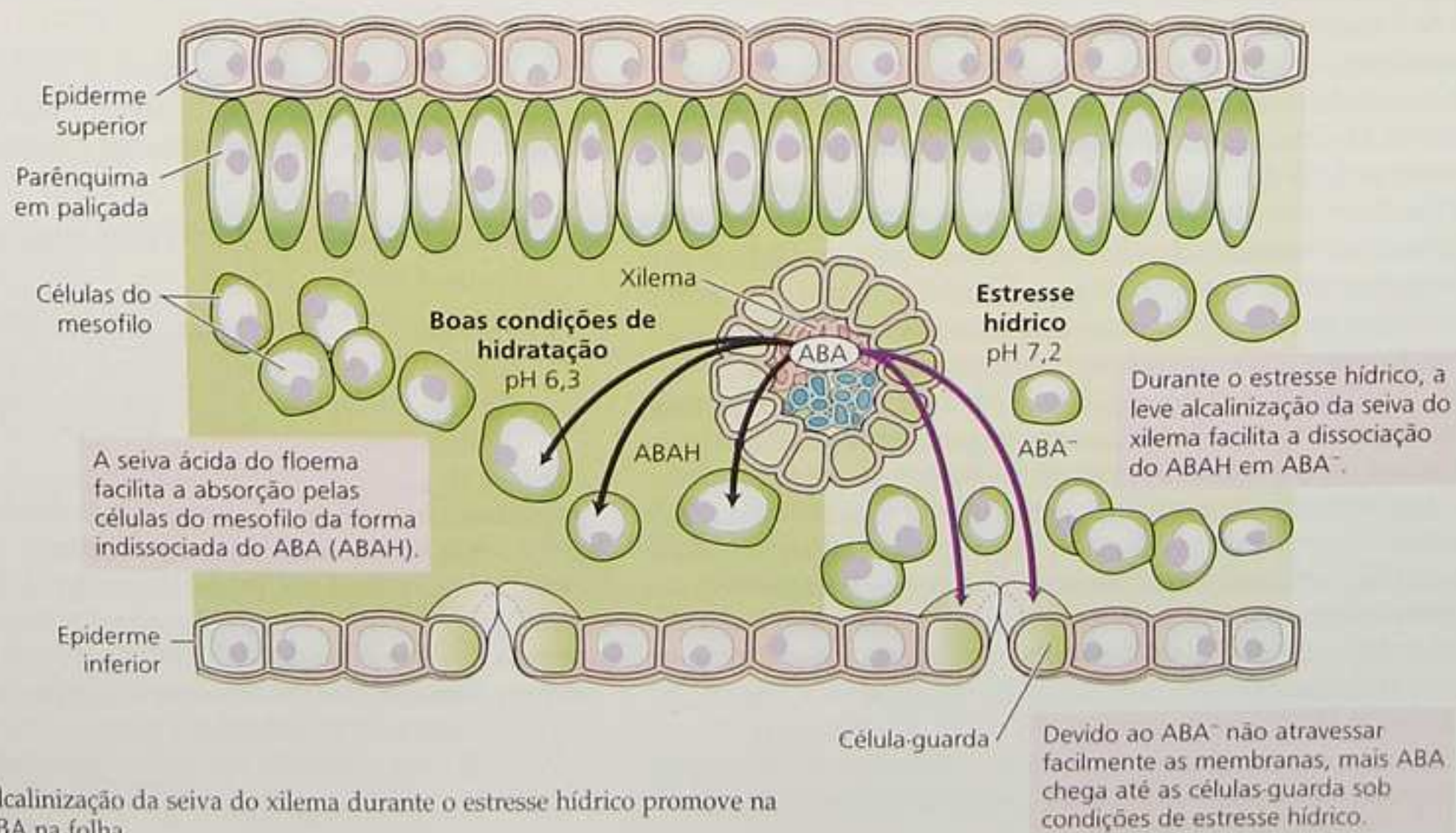



FIGURA 23.4 A alcalinização da seiva do xilema durante o estresse hídrico promove na redistribuição do ABA na folha.

originada dos tecidos maternos (ver **Tópico 1.2 na Internet**); o zigoto e o endosperma são originados das plantas parentais. Estudos genéticos em mutantes ABA-deficientes de *Arabidopsis* demonstraram que o genótipo do zigoto controla a síntese do ABA no embrião e no endosperma, e é essencial para a indução da dormência, enquanto que o genótipo materno controla o primeiro e principal pico de acúmulo do ABA, auxiliando na inibição da viviparidade na fase intermediária da embriogênese (Raz e cols., 2001).

O ABA promove a tolerância à dessecação no embrião

Uma importante função do ABA no desenvolvimento da semente é a promoção da aquisição da tolerância à dessecação. Como será descrito no Capítulo 25 (na fisiologia do estresse), a dessecação pode danificar severamente as membranas e outros constituintes celulares. Durante o período entre as fases intermediária e tardia do desenvolvimento da semente ocorre tanto o acúmulo de RNAs-mensageiros específicos quanto o aumento dos níveis endógenos do ABA. Estes RNAs-mensageiros codificam as chamadas proteínas abundantes da embriogênese tardia (do inglês LEA, *late-embryogenesis-abundant*), que parecem estar envolvidas na tolerância a dessecação. A síntese de muitas proteínas LEA ou membros relacionados à família pode ser induzida pelo ABA em tratamentos utilizando embriões jovens ou tecidos vegetativos. Assim, a síntese da maior parte das proteínas LEA está sob controle do ABA (ver **Tópico 23.4 na Internet**).

O ABA promove o acúmulo de proteínas de reserva nas sementes durante a embriogênese

Compostos de reserva são acumulados entre as fases intermediária e tardia da embriogênese. Devido à presença de elevados níveis do ABA nessa fase, supõe-se que o ABA possa afetar a translocação de açúcares e aminoácidos e/ou a síntese de materiais de reserva.

Estudos com mutantes deficientes tanto na síntese quanto na resposta ao ABA demonstraram que este hormônio não possui efeito na translocação de açúcar. Por outro lado, o ABA tem apresentado efeito na quantidade e na composição das proteínas de reserva. Por exemplo, o ABA exógeno promove o acúmulo de proteínas de reserva em embriões cultivados de várias espécies. Em alguns mutantes ABA-deficiente ou ABA-insensível, ocorre a redução no acúmulo de proteínas de reserva. Contudo, a síntese de proteínas de reserva é também reduzida em sementes desenvolvidas em mutantes com níveis e respostas normais do ABA, indicando que este é somente um dos vários sinais que controlam a expressão de genes de proteínas de reserva durante a embriogênese.

O ABA não somente regula o acúmulo de proteínas de reserva durante a embriogênese como pode também manter o embrião maduro em um estado de dormência, até que as condições ambientais sejam ótimas para o crescimento. A dormência de semente é um fator importante na adaptação dos vegetais a ambientes desfavoráveis. Como será discutido nas próximas seções, os vegetais desenvolveram variados mecanismos, alguns dos quais envolvendo o ABA, que permitem a manutenção de suas sementes em um estado de dormência.

A dormência das sementes pode ser imposta pela testa ou pelo embrião

Durante a maturação da semente, o embrião entra em uma fase quiescente em resposta à dessecação. A germinação da semente pode ser definida como a retomada do crescimento do embrião na semente madura; ela depende das mesmas condições ambientais das quais depende o crescimento vegetativo. A água e o oxigênio devem estar disponíveis, a temperatura deve ser adequada e não devem existir substâncias inibidoras.

Em muitos casos, uma semente viável (viva) não irá germinar mesmo se todas as condições ambientais para o crescimento sejam satisfeitas, fenômeno denominado **dormência da semente.** A dormência da semente induz um retardo temporal no processo de germinação, fornecendo um tempo adicional para a dispersão da semente. Isto também maximiza a sobrevivência das plântulas pela inibição da germinação sob condições desfavoráveis. Dois tipos de dormência de sementes têm sido identificadas: dormência imposta pela testa e dormência do embrião.

Dormência imposta pela testa. A dormência imposta ao embrião pela testa da semente e outros tecidos circundantes, como o endosperma, pericarpo ou órgãos extraflorais, é conhecida como **dormência imposta pela testa.** Os embriões dessas sementes irão germinar rapidamente na presença da água e do oxigênio uma vez que a testa e outros tecidos circundantes tenham sido removidos ou danificados. Existem cinco mecanismos básicos na dormência imposta pela testa (Bewley e Black, 1994):

1. Impedimento da absorção da água.
2. *Restrição mecânica.* O primeiro sinal visível da germinação é a quebra da testa da semente pela radícula (ver Glossário). No entanto, em alguns casos, a testa pode ser demasiadamente rígida para que ocorra a penetração da radícula. Para que as sementes germinem, as paredes das células do endosperma devem ser afrouxadas pela produção de enzimas que degradam parede celular.
3. *Interferência com as trocas gasosas.* A redução da permeabilidade da testa da semente ao oxigênio sugere que a testa inibe a germinação pela limitação do suprimento de oxigênio para o embrião.
4. *Retenção de inibidores.* A testa pode impedir a saída de inibidores da semente.
5. *Produção de inibidores.* A testa da semente e o pericarpo podem conter concentrações relativamente altas de inibidores de crescimento, incluindo o ABA, que pode impedir a germinação do embrião.

Dormência do embrião. O segundo tipo de dormência de semente é a **dormência do embrião,** uma dormência que é intrínseca ao embrião e que não é resultante de qualquer influência da testa da semente ou de outros tecidos circundantes. Em alguns casos, a dormência do embrião pode ser interrompida pela excisão dos cotilédones. Espécies nas quais os cotilédones exercem um efeito

inibitório incluem a avelã (*Corylus avellana*) e o freixo (*Fraxinus excelsior*).

Uma demonstração fascinante da capacidade dos cotilédones em inibir o crescimento é encontrada em espécies (p. ex., pêssego) nas quais o embrião dormente isolado germina, porém possui um crescimento extremamente lento, formando uma planta anã. Todavia, se os cotilédones são removidos em um estágio inicial do desenvolvimento, a planta muda abruptamente para um crescimento normal.

Acredita-se que a dormência do embrião deva-se à presença de inibidores, especialmente o ABA, bem como a ausência de promotores de crescimento, como o GA (ácido giberélico). A perda da dormência do embrião está freqüentemente associada à queda acentuada na razão entre ABA e GA.

Dormência primária **versus** *dormência secundária da semente.* Diferentes tipos de dormência de semente também podem ser distinguidas mais com base na determinação do tempo de início da dormência do que na causa da dormência:

- As sementes que são liberadas da planta em um estado dormente são ditas apresentarem **dormência primária.**
- As sementes que são liberadas da planta em um estado não-dormente, mas que se tornam dormente se as condições para a germinação forem desfavoráveis, são ditas apresentarem **dormência secundária**. Por exemplo, sementes de *Avena sativa* (aveia) podem se tornar dormentes na presença de temperaturas superiores ao máximo adequado para a germinação, enquanto que sementes de *Phacelia dubia* tornam-se dormentes em temperaturas abaixo do mínimo para germinação. Os mecanismos da dormência secundária são pouco compreendidos.

Fatores ambientais controlam a liberação da dormência das sementes

Vários fatores externos liberam a semente da dormência do embrião e sementes dormentes respondem tipicamente a mais de um dos três fatores seguintes:

1. *Pós-maturação.* Muitas sementes perdem a dormência quando os seus teores de umidade são reduzidos a um certo nível de dessecamento — um fenômeno conhecido como **pós-maturação.**
2. *Resfriamento.* Baixas temperaturas, ou **resfriamento,** podem liberar as sementes da dormência. Muitas sementes necessitam de um período de frio (0 — 10 °C) quando completamente hidratadas (embebidas), como condição para germinar.
3. *Luz.* Grande quantidade de sementes necessita de luz para germinar, podendo envolver apenas uma breve exposição, como no caso da alface, um tratamento intermitente (p. ex., nas suculentas do gênero *Kalanchoe*) ou mesmo um fotoperíodo envolvendo dias curtos e longos.

Para outras informações sobre os fatores ambientais que afetam a dormência das sementes, ver **Tópico 23.5 na Internet**. Para uma discussão sobre longevidade das sementes, ver **Tópico 23.6 na Internet**.

A dormência da semente é controlada pela razão entre ABA e GA

As sementes maduras podem ser dormentes ou não, dependendo da espécie. Sementes não-dormentes, como a ervilha, germinarão rapidamente se supridas apenas com água. Por outro lado, sementes dormentes não germinam na presença da água, necessitando de algum tratamento ou condição adicional. Conforme foi visto, pode ser conseqüência da rigidez ou da impermeabilidade da testa (a testa impondo a dormência) ou da manutenção do estado de impedimento do desenvolvimento do embrião. Exemplos deste último incluem sementes que necessitam de pós-maturação, de resfriamento ou de luz para germinar.

Mutantes do ABA têm sido extremamente úteis em demonstrar o papel deste hormônio na dormência de sementes. A dormência de sementes de *Arabidopsis* pode ser superada com um período de pós-maturação e/ou tratamento com frio. Foi demonstrado que os mutantes ABA-deficientes (*aba*) não eram dormentes na maturidade. Quando foram realizados cruzamentos recíprocos entre *aba* e plantas tipo selvagem, as sementes apresentaram dormência somente quando o embrião foi capaz de produzir ABA. Nem o ABA materno nem a aplicação exógena foram eficazes na indução da dormência do embrião *aba*.

Por outro lado, o ABA derivado do tecido materno constitui o principal pico presente nas sementes e é necessário para outros aspectos do desenvolvimento dessas — como, por exemplo, evitar a viviparidade na fase intermediária da embriogênese. Assim, as duas fontes de ABA funcionam em vias de desenvolvimento diferentes. A dormência é também muito reduzida em sementes do mutante ABA-insensível *abi1* (*ABA-insensível1*), *abi2*, e *abi3*, ainda que tais sementes contenham concentrações mais altas de ABA do que aquelas do tipo selvagem durante todo o desenvolvimento, possivelmente refletindo uma regulação por *feedback* do metabolismo do ABA. Os mutantes de tomateiro ABA-deficientes parecem funcionar da mesma maneira, indicando que o fenômeno é provavelmente geral. Entretanto, outros mutantes com dormência reduzida, mas com sensibilidade e níveis normais de ABA, indicam a presença de reguladores adicionais da dormência.

Embora o papel do ABA na iniciação e na manutenção da dormência da semente é bem-estabelecido, outros hormônios contribuem para o efeito total. Por exemplo, o pico de produção do ABA em sementes de muitas plantas coincide com um declínio nos níveis de AIA e GA.

A importância da razão entre ABA e GA nas sementes foi demonstrada a partir da triagem genética que levou ao isolamento do primeiro mutante ABA-deficiente em *Arabidopsis* (Koornneef e cols., 1982). Sementes mutantes GA-deficientes que não poderiam germinar na ausência do GA exógeno foram tratadas com mutagênicos e em seguida crescidas em casa de vegetação. As sementes produzidas por essas plantas foram selecionadas para a **reversão** (do inglês, *revertants*) — isto é, as sementes recuperaram a capacidade de germinar.

Observou-se que tais sementes isoladas para a reversão eram mutantes da síntese do ácido abscísico. Aquelas que apresentaram a reversão germinaram porque não ocorria a indução da dormência. Assim, a subseqüente síntese do GA não era necessária para superar esse efeito. O estudo ilustra o princípio geral de que o balanço entre os hormônios vegetais é freqüentemente mais crítico do que as suas concentrações absolutas na regulação do desenvol-

vimento. Entretanto, o ABA e o GA exercem seus efeitos na dormência da semente em diferentes períodos, de modo que os seus efeitos antagônicos na dormência não refletem necessariamente uma interação direta.

Recentes triagens genéticas para supressores da insensibilidade ao ABA identificaram interações antagônicas adicionais entre o ABA e o etileno ou brassinosteróides que afetam a germinação. Além disso, muitos alelos novos de mutantes ABA-deficientes ou *ABA-insensível4* (*abi4*) têm sido identificados nas triagens para alterações na sensibilidade ao açúcar. Tais estudos indicam que uma complexa rede de regulação integra a sinalização de hormônios e nutrientes.

O ABA inibe a germinação precoce e a viviparidade

Quando embriões imaturos são removidos de suas sementes e colocados em cultura para completar o seu desenvolvimento, antes do início da dormência, eles germinam precocemente — isto é, sem passar pelos estágios normais de quiescência ou de dormência. O ABA adicionado ao meio de cultura inibe essa germinação precoce. Tal resultado, em combinação com o fato de que o nível endógeno do ABA na semente é alto entre as fases intermediária e tardia do desenvolvimento, sugere que o ABA seja o repressor natural que mantém o estado embriogênico do embrião em desenvolvimento.

Evidências adicionais do papel do ABA na inibição da germinação precoce têm sido fornecidas por estudos genéticos da viviparidade. A tendência à viviparidade, também conhecida como *germinação pré-colheita*, é uma característica varietal dos cereais favorecida pelo clima úmido. No milho, foram selecionados vários mutantes vivíparos (*vp*) nos quais os embriões germinam diretamente na espiga enquanto ainda ela está conectada à planta. Vários desses mutantes são ABA-deficientes (*vp2*, *vp5*, *vp7* e *vp14*) (ver Figura 23.3); um é ABA-insensível (*vp1*). A viviparidade nos mutantes ABA-deficientes pode ser parcialmente evitada por tratamentos com ABA exógeno. A viviparidade em milho também necessita da síntese do GA na fase inicial da embriogênese como um sinal positivo; os duplos mutantes deficientes tanto no GA quanto no ABA não apresentam viviparidade (White e cols., 2000).

Ao contrário dos mutantes de milho, os mutantes de um único gene de *Arabidopsis* (*aba1*, *aba3*, *abi1* e *abi3*) não exibem viviparidade, embora não sejam dormentes. A falta da viviparidade deve ser o resultado da ausência da umidade, pois essas sementes germinam no interior dos frutos sob condições de alta umidade relativa. Entretanto, outros mutantes de *Arabidopsis* com resposta normal ao ABA e com níveis moderadamente reduzidos de ABA (p. ex., *fusca3*, pertencente a classe de mutantes[1] deficientes na regulação da transição da embriogênese para a germinação) apresentam alguma viviparidade mesmo em baixas umidades. Ademais, os duplos mutantes que combinam a deficiência na síntese do ABA ou na resposta ao ABA com a mutação *fusca3* apresentam alta freqüência de viviparidade (Nambara e cols., 2000), sugerindo que mecanismos redundantes de controle impedem a viviparidade em *Arabidopsis*.

[1]Denominação de acordo com o termo latino empregado para designar a cor castanho-vermelhado dos embriões.

O ABA é acumulado nas gemas dormentes

Nas espécies lenhosas, a dormência é um importante caráter adaptativo em climas frios. Quando uma árvore é exposta a temperaturas muito baixas, no inverno, ela protege seus meristemas com escamas e o crescimento cessa temporariamente. Tal resposta a baixas temperaturas necessita de um mecanismo sensorial que detecte as mudanças ambientais (sinais sensoriais), além de um sistema de controle que realiza a transdução dos sinais sensoriais e desencadeia o processo de desenvolvimento, levando à dormência das gemas.

O ABA foi sugerido originalmente como o hormônio que induz à dormência, em decorrência de se acumular nas gemas dormentes e de diminuir os seus níveis após o tecido haver sido exposto a baixas temperaturas. No entanto, estudos posteriores demonstraram que o conteúdo de ABA nas gemas nem sempre possui correlação com o grau de dormência. Como foi visto no caso das sementes dormentes, essa aparente discrepância poderia refletir as interações entre o ABA e outros hormônios como parte do processo no qual a gema dormente e o crescimento são regulados pelo balanço entre inibidores de crescimento, como o ABA, e substâncias que induzem o crescimento, como as citocininas e as giberelinas.

Embora muitos progressos tenham sido alcançados na elucidação do papel do ABA na dormência das sementes, utilizando mutantes ABA-deficientes, o avanço no conhecimento do papel do ABA na dormência das gemas, o qual se aplica principalmente para gemas de lenhosas perenes, encontra-se em atraso pela inexistência de um sistema genético adequado. Tal discrepância ilustra a extraordinária contribuição que a genética e a biologia molecular têm oferecido à fisiologia vegetal, indicando a necessidade de se estenderem essas abordagens para as espécies lenhosas.

As análises de tais características, como a dormência, são dificultadas pelo fato de que elas são freqüentemente controladas por ações combinadas de vários genes, resultando em uma variação gradual de fenótipos referidos como *caracteres quantitativos*. Recentes pesquisas de mapas genéticos sugerem que homólogos do *ABI1* podem regular a dormência de gemas em árvores de álamo. Para a descrição destes estudos, ver **Tópico 23.7 na Internet**.

O ABA inibe a produção de enzimas induzidas pelo GA

O ABA inibe a síntese de enzimas hidrolíticas que são fundamentais para a quebra das reservas armazenadas nas sementes. Por exemplo, o GA estimula a camada de aleurona dos grãos de cereais a produzir α-amilase e outras enzimas hidrolíticas, que quebram as reservas do endosperma durante a germinação (ver Capítulo 20). O ABA inibe a síntese dessas enzimas dependentes do GA, pela inibição da transcrição do mRNA da α-amilase. O ABA exerce seu efeito inibitório por pelo menos dois mecanismos:

1. A VP1, uma proteína originalmente identificada como um ativador da expressão do gene induzido pelo ABA, age como um repressor transcricional de alguns genes regulados pelo GA (Hoecker e cols., 1995).
2. O ABA reprime a expressão do GA-MYB induzido pelo GA. O GA-MYB é um fator de transcrição que regula a expressão da α-amilase induzida pelo GA (Gómez-Cadenas e cols., 2001).

O ABA fecha os estômatos em resposta ao estresse hídrico

O esclarecimento do papel do ABA nas respostas ao estresse hídrico, ao frio e à salinidade (ver Capítulo 25) levou à sua caracterização como um hormônio do estresse. Conforme observado inicialmente, a concentração do ABA nas folhas pode aumentar até 50 vezes sob condições de seca — a alteração de concentração mais severa descrita para um hormônio em resposta a um sinal ambiental. A redistribuição ou a biossíntese do ABA é muito eficaz no fechamento estomático e seu acúmulo em folhas estressadas exerce um importante papel na redução da perda de água, pela transpiração, sob condições de estresse hídrico (Figura 23.5).

O fechamento estomático pode também ser causado pelo transporte do ABA sintetizado nas raízes para a parte aérea. Os mutantes que perderam a capacidade para produzir o ABA exibem uma murcha permanente e são chamados de mutantes *wilty*, devido à sua incapacidade de fechar os estômatos. A aplicação exógena do ABA nesses mutantes leva ao fechamento estomático e à restauração da pressão de turgor.

Em baixos potenciais hídricos, o ABA promove o crescimento das raízes e inibe o crescimento da parte aérea

O ABA apresenta diferentes efeitos no crescimento das raízes e da parte aérea. Tais efeitos são profundamente dependentes da condição de água da planta. A Figura 23.6 compara o crescimento das raízes e da parte aérea em plântulas de milho crescidas sob condições abundantes de água (alto potencial hídrico) ou sob condições de desidratação (baixo potencial hídrico). Foram utilizados dois tipos de plântulas: (1) plântulas tipo selvagem com níveis normais de ABA e (2) um mutante vivíparo, ABA-deficiente.

Quando o suprimento de água é abundante (alto potencial hídrico), o crescimento da parte aérea é maior na planta tipo selvagem (níveis endógenos normais de ABA) do que no mutante ABA-deficiente. O crescimento reduzido da parte aérea no mutante ABA-deficiente poderia ser decorrente, em parte, da perda excessiva de água pelas folhas. Entretanto, em plantas de milho e tomate, o crescimento atrofiado da parte aérea em altos potenciais hídricos das plantas ABA-deficientes parece ser devido à superprodução de etileno, o qual é normalmente inibido pelo ABA endógeno (Sharp e cols., 2000). Essa descoberta sugere que o ABA endógeno promove o crescimento da parte aérea em plantas bem hidratadas por inibir a produção de etileno.

Quando a água é limitante (i. é, em baixos potenciais hídricos), ocorre o oposto: o crescimento da parte aérea é maior no mutante ABA-deficiente do que no tipo selvagem. Assim, o ABA endógeno age como um sinal para reduzir o crescimento da parte aérea somente sob condições de estresse hídrico.

Agora será examinado de que forma o ABA afeta as raízes. Quando a água é abundante, o crescimento da raiz é levemente maior no tipo selvagem (níveis endógenos normais de ABA) do que no mutante ABA-deficiente, resultado semelhante ao crescimento observado para a parte aérea. Entretanto, em altos potenciais hídricos (quando os níveis totais de ABA são baixos), o ABA endógeno exerce um leve efeito positivo tanto no crescimento das raízes quanto na das partes aéreas.

Entretanto, sob condições de desidratação, o crescimento das raízes é muito superior no tipo selvagem que no mutante ABA-deficiente, embora o crescimento esteja ainda inibido em relação ao crescimento da raiz de ambos genótipos quando a água é abundante. No caso, o ABA endógeno promove o crescimento da raiz aparentemente por inibir a produção de etileno durante o estresse hídrico (Spollen e cols., 2000).

Resumindo, sob condições de desidratação, quando os níveis de ABA estão altos, o hormônio endógeno exerce um forte efeito positivo no crescimento da raiz por suprimir a produção de etileno e um leve efeito negativo no crescimento da parte aérea. O efeito geral é um aumento marcante da razão raiz: parte aérea em baixos potenciais de água (ver Figura 23.6C), o qual, juntamente com o efeito do ABA no fechamento dos estômatos, auxilia a planta a enfrentar o estresse hídrico. Para outro exemplo do papel do ABA na resposta a desidratação, ver **Ensaio 1 na Internet**.

Mantido com água
Fornecimento de água
Potencial hídrico da folha (MPa)
0
−0,8
−1,6
O potencial hídrico diminui à medida que o solo perde água
Resistência estomática ($s\ cm^{-1}$)
70
35
20
0
Diminuição da resistência estomática (os estômatos abrem quando o solo é reidratado)
Conteúdo de ABA
ABA ($ng\ cm^{-2}$)
8
4
0
0 2 4 6 8
Tempo (dias)

FIGURA 23.5 Alterações no potencial hídrico, na resistência estomática (o inverso da condutância estomática) e no conteúdo de ABA em milho, em resposta ao estresse hídrico. À medida que o solo perde água, o potencial hídrico das folhas decresce e aumenta tanto o conteúdo de ABA quanto à resistência estomática. O processo foi revertido pela rega (Beardsell e Cohen, 1975).

O ABA promove a senescência foliar independentemente do etileno

O ácido abscísico foi isolado originalmente como um fator causador de abscisão. Entretanto, tem-se tornado evidente que o ABA estimula a abscisão de órgãos em apenas poucas espécies e que o principal hormônio causador da abscisão, é o etileno. Por outro lado, o ABA está claramente envolvido na senescência foliar, considerando-se que essa promoção da senescência deva-se indiretamente ao aumento da síntese de etileno que estimula a abscisão. (Para maior discussão da relação entre o ABA e o etileno, ver **Tópico 23.8 na Internet**.)

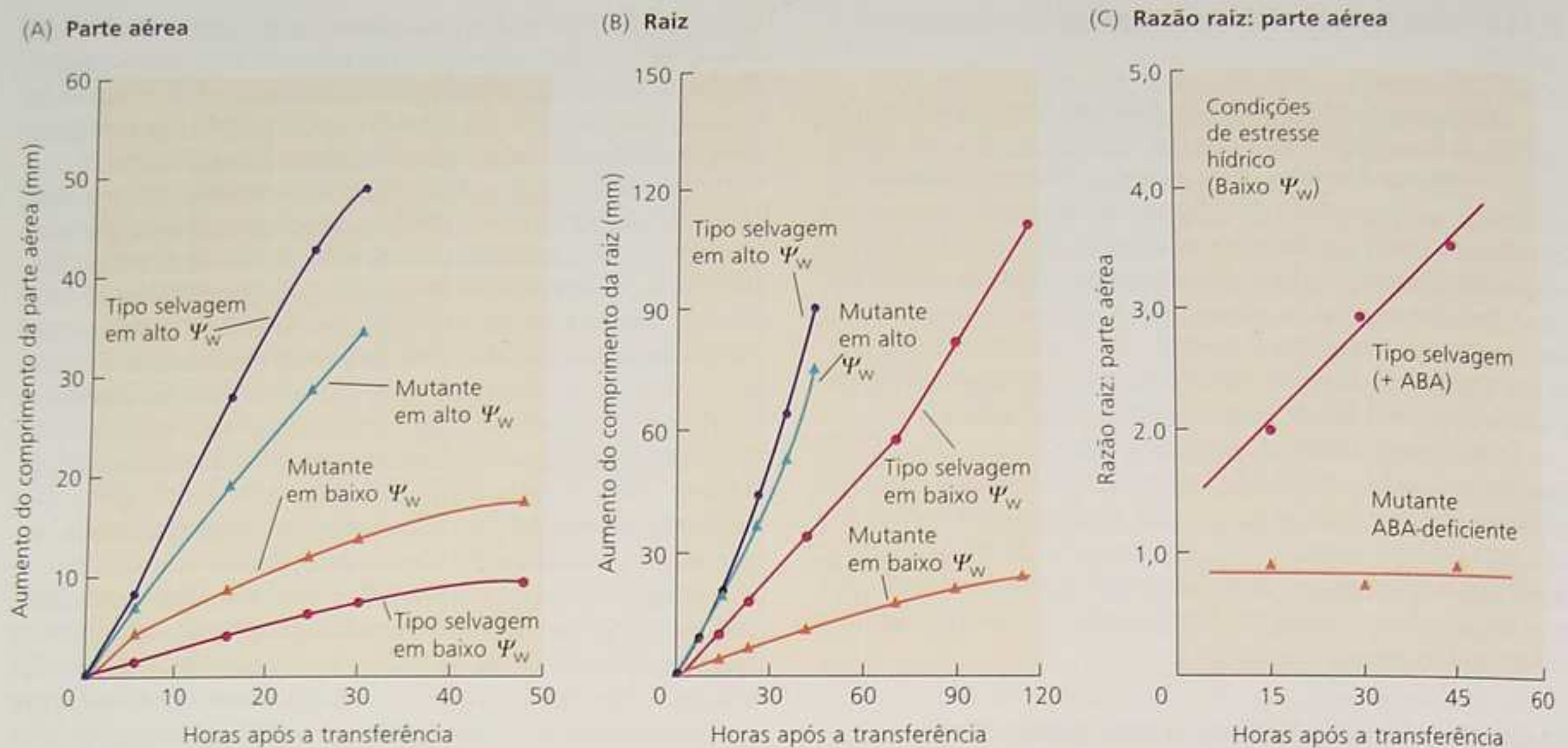



FIGURA 23.6 Comparação do crescimento das partes aéreas (A) e das raízes (B) de plantas normais de milho em comparação com mutantes ABA-deficientes (vivíparos) crescidas em vermiculita e mantidas em alto potencial hídrico (–0,03 MPa) ou em baixo potencial hídrico (–0,3 MPa em A e –1,6 MPa em B). O estresse hídrico (baixo potencial hídrico) diminui o crescimento tanto das raízes quanto das partes aéreas comparado com os controles. (C) Observe que sob estresse hídrico (baixo ψ_w), a taxa de crescimento da raiz, comparada com a da parte aérea, é muito maior quando o ABA está presente (i. é, no tipo selvagem) do que quando ele está ausente (no mutante) (Saab e cols., 1990).

A senescência foliar tem sido extensivamente estudada, estando descritas no Capítulo 16 as mudanças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem durante este processo. Segmentos de folhas senescem mais rapidamente no escuro que na luz, e tornam-se amarelados como resultado da degradação da clorofila. Além disso, a degradação de proteínas e de ácidos nucléicos é aumentada devido à ativação de várias hidrolases. O ABA acelera intensamente a senescência tanto dos segmentos foliares quanto das folhas ligadas à planta.

MODOS DE AÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO ABA

O ABA está envolvido nos efeitos fisiológicos de curto prazo (p. ex., fechamento estomático), bem como nos processos de longo prazo do desenvolvimento (p. ex., maturação de sementes). Respostas fisiológicas de curto prazo envolvem freqüentemente alterações no fluxo de íons através da membrana, assim como podem envolver a regulação de alguns genes, enquanto que os processos de longo prazo envolvem inevitavelmente maiores alterações no padrão da expressão de genes.

As vias de transdução de sinal, que amplificam o sinal primário gerado quando o hormônio se liga a seu receptor, são necessárias para os efeitos do ABA, tanto em curto quanto em longo prazo. Estudos genéticos têm demonstrado que muitos componentes reguladores da sinalização são conservados tanto nas respostas em curto prazo quanto em longo prazo, indicando que eles compartilham de mecanismos comuns de sinalização. Nesta seção será descrito o que se conhece com relação ao mecanismo de ação do ABA nos níveis celular e molecular.

O ABA é percebido por receptores extra e intracelulares

Embora tenha sido demonstrado que o ABA interage diretamente com os fosfolipídeos, é amplamente aceito que o receptor do ABA é uma proteína. No entanto, até o momento, a proteína receptora do ABA não foi identificada. Experimentos têm sido realizados para determinar se o hormônio deve entrar na célula para ser efetivo ou se ele pode agir externamente pela ligação a um receptor localizado na superfície externa da membrana plasmática. Os resultados obtidos até aqui sugerem múltiplos sítios de percepção.

Alguns experimentos indicam um receptor na superfície externa da célula. Por exemplo, a microinjeção do ABA não alterou a abertura estomática de tradescância *Commelina*, nem inibiu a síntese da α-amilase induzida pelo GA em protoplastos da camada de aleurona de cevada (Anderson e cols., 1994; Gilroy e Jones, 1994). Além disso, os conjugados ABA-proteína que não atravessam a membrana têm demonstrado ativar tanto canais de íons quanto a expressão de genes (Schultz e Quatrano, 1997; Jeannette e cols., 1999).

Outros experimentos, entretanto, sustentam uma localização intracelular para o receptor do ABA:

- A aplicação extracelular do ABA foi aproximadamente duas vezes mais efetiva na inibição da abertura estomática em pH

6,15, condição em que o ABA está completamente protonado e é rapidamente absorvido pelas células guarda, em contraste com o pH 8,0, condição na qual o ABA está, em grande parte, dissociado na forma aniônica que dificilmente atravessa as membranas (Anderson e cols., 1994).

- A aplicação do ABA diretamente e continuamente no citosol utilizando uma pipeta microcapilar, inibe os canais de K^+_{in}, os quais são necessários para a abertura estomática (Schwartz e cols., 1994).
- A microinjeção de uma forma inativa "aprisionada" do ABA nas células guarda de *Commelina* resulta no fechamento estomático, após os estômatos serem tratados brevemente com radiação UV para ativar o hormônio — isto é, liberá-lo do aprisionamento molecular (Figura 23.7) (Allan e cols., 1994). As células-guarda controles, injetadas com uma forma não-fotolizável do ABA aprisionado, não se fecharam após a irradiação com UV.

Considerados em conjunto, tais resultados indicam que a percepção extracelular do ABA pode evitar a abertura estomática e regular a expressão gênica e que o ABA intracelular tanto pode induzir o fechamento estomático quanto inibir o fluxo do K^+_{in} necessário para a abertura. Assim, parecem existir receptores extra e intracelulares do ABA. Porém, eles ainda devem ser identificados ou localizados.

O ABA aumenta o Ca^{2+} do citosol, eleva o pH citosólico e despolariza as membranas

Conforme discutido no Capítulo 18, o fechamento estomático é induzido pela redução da pressão de turgor, causada pelo massivo efluxo de K^+ e ânions da célula. Durante a posterior diminuição da célula, decorrente da perda de água, a área superficial da membrana pode contrair até 50%. Para aonde vai a sobra da membrana? A resposta parece ser que elas são retiradas por endocitose como pequenas vesículas — um processo que também envolve a reorganização do citoesqueleto de actina. Entretanto, a primeira alteração detectável após a exposição das células-guarda ao ABA é a despolarização transitória da membrana causada pelo influxo de cargas positivas e o aumento transitório da concentração de cálcio citosólico (Figura 23.8).

O ABA estimula o aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico pela indução tanto do influxo através de canais da membrana plasmática, quanto da liberação do cálcio no interior do citosol a partir de compartimentos internos, como o vacúolo central (Schroeder e cols., 2001). O estímulo do influxo ocorre via uma rota que utiliza as **espécies reativas de oxigênio** (ERO), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) como mensageiros secundários que levam a ativação de canais da membrana plasmática (Pei e cols., 2000).

A liberação do cálcio a partir das reservas intracelulares pode ser induzida por vários mensageiros secundários, incluindo o ino-

(A)

UV

H_3C CH_3 CH_3 OH O CH_3 CH_3 CO_2CH O_2N

H_3C CH_3 CH_3 OH O CH_3 COOH + HO — CH CH_3 O_2N

Aprisionador fotolizável do ABA

***(S)-cis*-ABA**

(B)

Abertura (μm)

Tempo (min)

Não-injetadas

Aprisionador não-fotolizável do ABA

Lampejo de 30 s

Aprisionador fotolizável do ABA

(C)

(D)

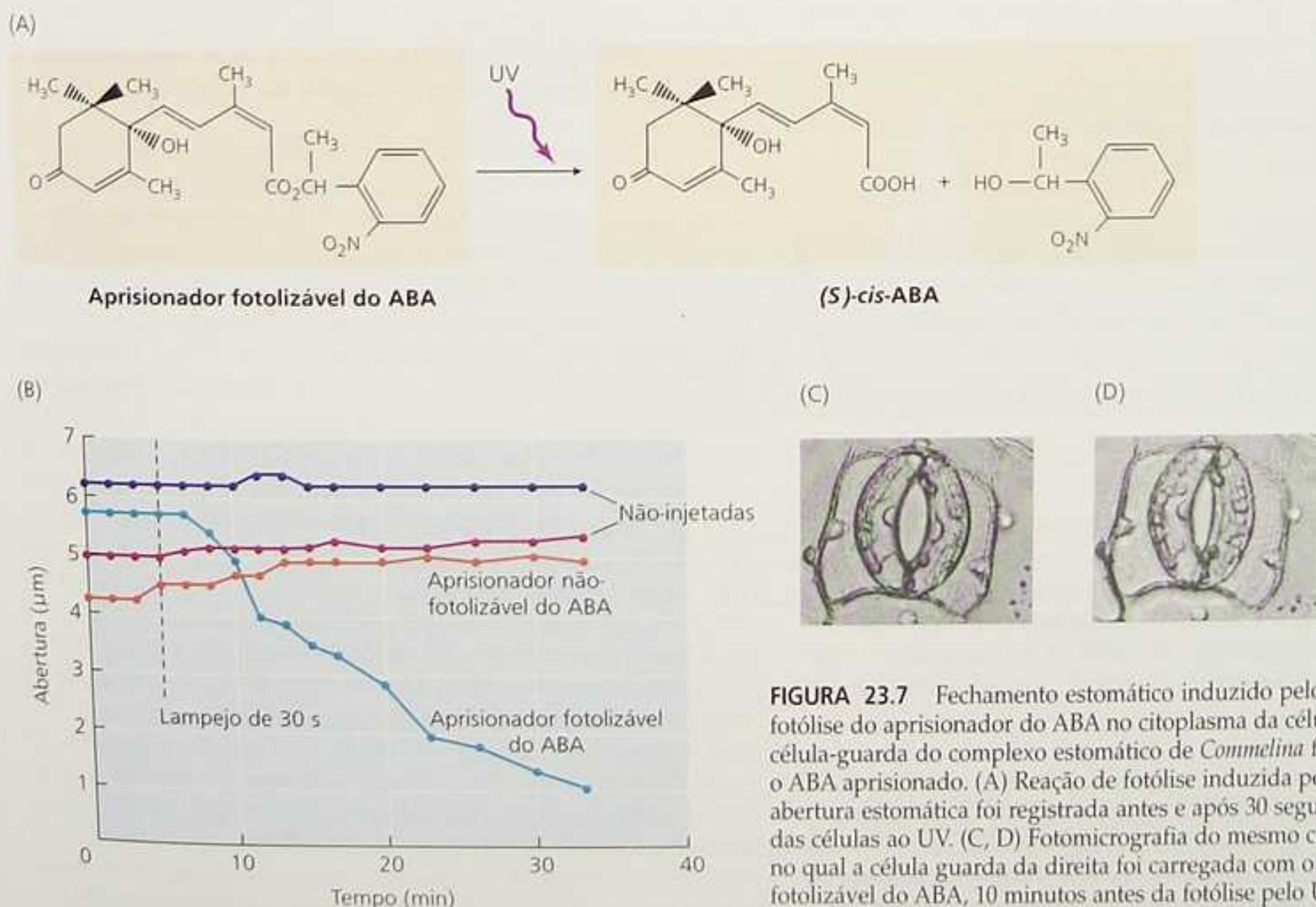



FIGURA 23.7 Fechamento estomático induzido pelo UV, causado pela fotólise do aprisionador do ABA no citoplasma da célula guarda. Uma célula-guarda do complexo estomático de *Commelina* foi microinjetada com o ABA aprisionado. (A) Reação de fotólise induzida pela radiação UV. (B) A abertura estomática foi registrada antes e após 30 segundos de exposição das células ao UV. (C, D) Fotomicrografia do mesmo complexo estomático no qual a célula guarda da direita foi carregada com o aprisionador fotolizável do ABA, 10 minutos antes da fotólise pelo UV (C) e 30 minutos após a fotólise (D). (A e B de Allan e cols., 1994; C e D A. Allan, de Allan e cols., 1994; © American Society of Plant Biologists, impresso, com permissão.)

sitol 1,4,5-trifosfato (IP_3), o ADP-ribose cíclico (ADPRc), bem como o próprio aumento (induzido pelo cálcio) da liberação do Ca^{2+}. Estudos recentes têm demonstrado que o ABA estimula a síntese do **óxido nítrico (ON)** nas células-guarda, o qual induz o fechamento estomático de forma dependente do ADPRc, indicando que o ON é um mensageiro secundário inicial dessa via de resposta (Neill e cols., 2002) (para conhecer o ON, ver **Capítulo 14 na Internet**).

A combinação do influxo do cálcio e a liberação do cálcio das reservas internas, elevam as concentrações citosólicas de 50 para 350 n*M*, podendo chegar a 1.100 n*M* (1,1 m*M*) (Figura 23.9) (Mansfield e McAinsh, em Davies, 1995). Esse aumento é suficiente para causar o fechamento estomático, como é demonstrado pelo experimento que segue.

Assim como no experimento descrito anteriormente, o cálcio foi microinjetado nas células guarda em uma forma aprisionada, que poderia ser hidrolisada por um pulso de luz UV. Este método permite aos pesquisadores controlar tanto a concentração de cálcio livre quanto o tempo para a liberação no citosol. Nas concentrações citosólicas de 600 n*M* ou maiores, o cálcio liberado do aprisionador desencadeia o fechamento estomático (Gilroy e cols., 1990). Tal nível de cálcio intracelular corresponde às concentrações observadas após o tratamento com ABA.

Em estudos prévios, o cálcio livre intracelular foi medido pela microinjeção do corante fluorescente cálcio-sensível[2], como o *fura*-2 ou *indo*-1. Entretanto, as microinjeções do corante fluorescente em uma única célula são difíceis e freqüentemente resultam na morte celular. As taxas viáveis de sucesso das injeções em células guarda de *Arabidopsis* podem ser menores que 3%. Por outro lado, plantas transgênicas expressando o gene para a proteína indicadora de cálcio *yellow cameleon* torna possível monitorar paralelamente várias células fluorescentes, sem a necessidade de injeções invasivas (Allen e cols., 1999b) (ver **Tópico 23.9 na Internet**). Estes estudos têm demonstrado que a concentração do Ca^{2+} citosólico varia com periodicidades distintas, dependendo dos sinais recebidos (Figura 23.10).

Os resultados apresentados sustentam a hipótese de que um aumento no cálcio citosólico, parcialmente obtido das reservas intracelulares, é o responsável pelo fechamento estomático induzido pelo ABA. Entretanto, o hormônio de crescimento auxina pode induzir a abertura estomática, tal como o ABA induz o fechamento, acompanhado pelo *aumento* do cálcio citosólico. Essa descoberta sugere que as características detalhadas da localização e da periodicidade da oscilação do Ca^{2+} ("*Ca^{2+} signature*"), mais do que a concentração total do cálcio citosólico, é o que determina a resposta celular.

Além do aumento da concentração do cálcio citosólico, o ABA promove a alcalinização do citosol de cerca de pH 7,67 para pH 7,94. Tem sido demonstrado que o aumento do pH citosólico ativa os canais de membrana para o efluxo do K^+, aparentemente pelo

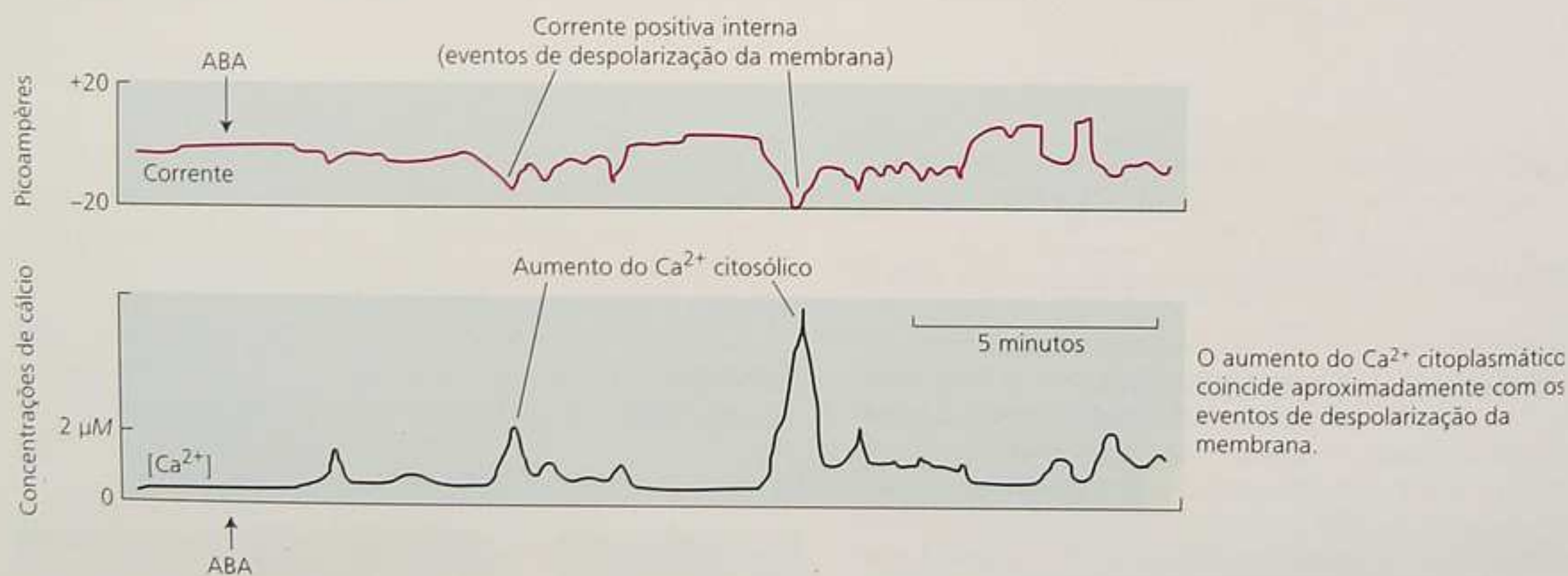



FIGURA 23.8 Medidas simultâneas do aumento interno das correntes positivas e das concentrações do Ca^{2+} citosólico induzidos pelo ABA nas células guarda de *Vicia faba* (fava). A corrente foi medida pela técnica *patch clamp**; o cálcio foi medido com o uso de um corante indicador fluorescente. O ABA foi adicionado ao sistema no ponto indicado pela seta, em cada caso (Schroeder e Hagiwara, 1990).

[2]O corante fluorescente de medida radiométrico sofre uma mudança em seus espectros de excitação e emissão quando ligados ao cálcio. Baseado nessa propriedade, pode-se determinar a concentração intracelular de ambas as formas do corante (ligada ou não ao cálcio) pela excitação utilizando dois comprimentos de onda apropriados. A razão entre as duas emissões possibilita uma medida da concentração de cálcio que é independente da concentração do corante.

*N. de T. Desenvolvida para células animais, esta técnica vem sendo utilizada para células vegetais. Por meio de uma leve pressão, um pequeno pedaço da membrana é retirada e fixada no ápice de um eletrodo. A técnica permite o estudo de canais iônicos quanto à seletividade, abertura e fechamento, além da capacidade de ativação.

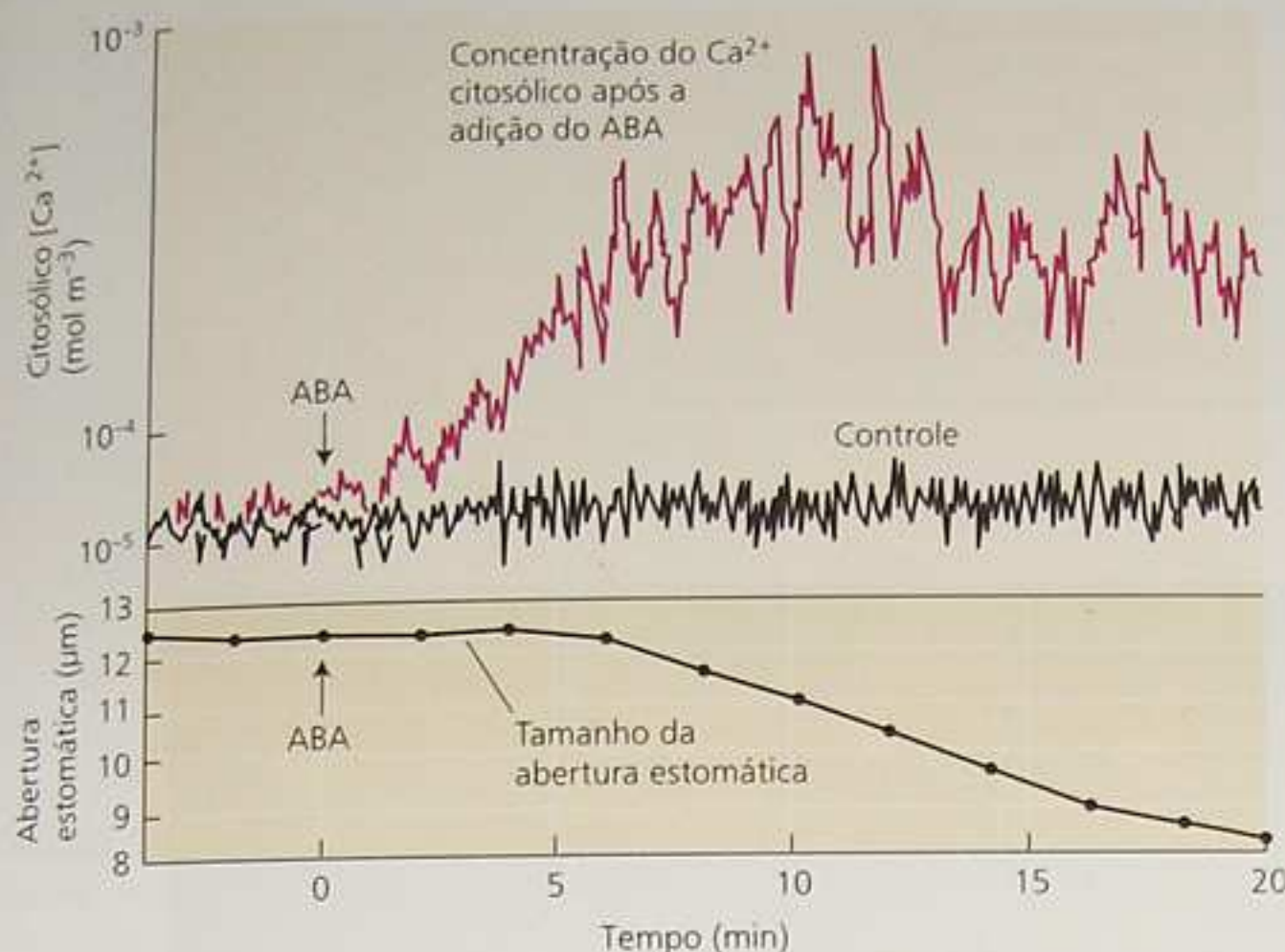



FIGURA 23.9 Aumento das concentrações do Ca^{2+} citosólico induzido pelo ABA nas células guarda (parte superior do gráfico) e da abertura estomática induzida pelo ABA (parte inferior do gráfico) ao longo do tempo (Mansfield e McAinsh, 1995).

aumento do número de canais disponíveis para ativação (ver Capítulo 6).

A ativação pelo ABA de canais aniônicos tipo *slow* causa uma despolarização de longa duração da membrana

A rápida e temportária despolarização induzida pelo ABA é insuficiente para abrir os canais de efluxo do K^+, os quais necessitam de uma despolarização da membrana de longa duração para abrir. Entretanto, tem sido demonstrado que o ácido abscísico induz despolarizações de longa duração. De acordo com o modelo mais amplamente aceito, a despolarização de longa duração da membrana é desencadeada por dois fatores: (1) uma despolarização transiente da membrana plasmática induzida pelo ABA, associada com (2) um aumento do cálcio citosólico. Ambas condições são necessárias para abrir os canais aniônicos tipo *slow* (tipo-S) da membrana plasmática ativados pelo cálcio (Schroeder e Hagiwara, 1990) (ver Capítulo 6). Tem sido indicado que o ABA ativa canais aniônicos tipo *slow* nas células guarda (Grabov e cols., 1997; Pei e cols., 1997).

A abertura prolongada desses canais de ânions tipo *slow* permitem que grandes quantidades de Cl^- e íons malato^{2-} saiam da célula, movendo-se ao longo de seu gradiente eletroquímico. (O lado interno da célula é carregado negativamente, assim, empurra o Cl^- e o malato^{2-} para fora da célula, e o lado externo possui menores concentrações de Cl^- e malato^{2-} do que o interior). O fluxo para o exterior dos íons Cl^- e malato^{2-} carregados negativamente gera uma forte despolarização da membrana, desencadeando a abertura dos canais voltagem-dependentes de efluxo do K^+.

Em apoio a este modelo, os inibidores que bloqueiam os canais tipo *slow*, como o ácido 5-nitro-2,3-fenilpropilaminobenzóico (NPPB), também bloqueia o fechamento estomático induzido pelo ABA. Inibidores dos canais de ânions tipo *rapid* (tipo-R), como o ácido 4,4'-diisotiocianatostilbeno-2,2'-dissulfônico (DIDS), não apresentam efeito no fechamento estomático induzido pelo ABA (Schwartz e cols., 1995).

Um outro fator que pode contribuir para a despolarização da membrana é a inibição da H^+-ATPase da membrana plasmática. O ABA inibe a ativação das bombas de prótons promovida pela luz azul, nos protoplastos das células guarda (Figura 23.11), coerente com o modelo de que a despolarização da membrana plasmática pelo ABA é em parte causada por uma diminuição na atividade da H^+-ATPase da membrana plasmática. Entretanto, o ABA não inibe diretamente a bomba de prótons.

Especialmente em *Vicia faba* (fava), a H^+-ATPase da membrana plasmática das folhas é fortemente inibida pelo cálcio. Uma concentração de cálcio de 0,3 μM bloqueia 50% da atividade da H^+-ATPase e 1 μM de cálcio bloqueia completamente esta enzima (Kinoshita e cols., 1995). Aparentemente, esses dois fatores contribuem para a inibição da bomba de prótons da membrana plasmática pelo ABA: um aumento na concentração citosólica do cálcio e a alcalinização do citosol.

Além de provocar o fechamento estomático, o ABA inibe a abertura estomática induzida pela luz. Neste caso, o ABA age pela inibição dos canais de influxo do K^+, abertos quando a membrana é hiperpolarizada pela bomba de prótons (ver Capítulos 6 e 18). A inibição dos canais de influxo de K^+ é mediada pelo aumento da concentração do cálcio citosólico induzido pelo ABA. Assim, o cálcio e o pH afetam os canais das células guarda de duas maneiras:

1. Eles inibem a abertura estomática pela inibição dos canais de influxo do K^+ e das bombas de prótons da membrana plasmática.
2. Eles promovem o fechamento estomático pela ativação dos canais que direcionam os ânions para fora, levando assim a ativação dos canais de efluxo do K^+.

O ABA estimula o metabolismo dos fosfolipídeos

Conforme discutido anteriormente, muitas evidências apóiam o papel do cálcio tanto na promoção do fechamento estomático quanto na inibição da abertura estomática. De acordo com a clássica via de transdução de sinal cálcio-dependente das células animais, o IP_3 é liberado, junto com o diacilglicerol (DAG), quando a fosfolipase C é ativada por uma proteína G da membrana plasmática (ver **Capítulo 14 na Internet**). Será que o ABA utiliza a mesma via quando induz o fechamento estomático?

Em concordância com este modelo, tem sido demonstrado que o ABA estimula o metabolismo fosfoinositídio em células guarda de *Vicia faba* (fava). Para detectar o efeito do ABA na liberação do IP_3, foi necessário incluir Li^+ no meio de incubação como um inibidor da fosfatase inositol, a qual remove rapidamente o grupo fosfato do IP_3. Sob tais condições, foi observado um aumento de 90% no nível do IP_3 induzido pelo ABA, dentro de 10 segundos de tratamento com o hormônio (Lee e cols., 1996). Estudos recentes em *Arabidopsis* utilizando DNA anti-senso para

(A)

(B)

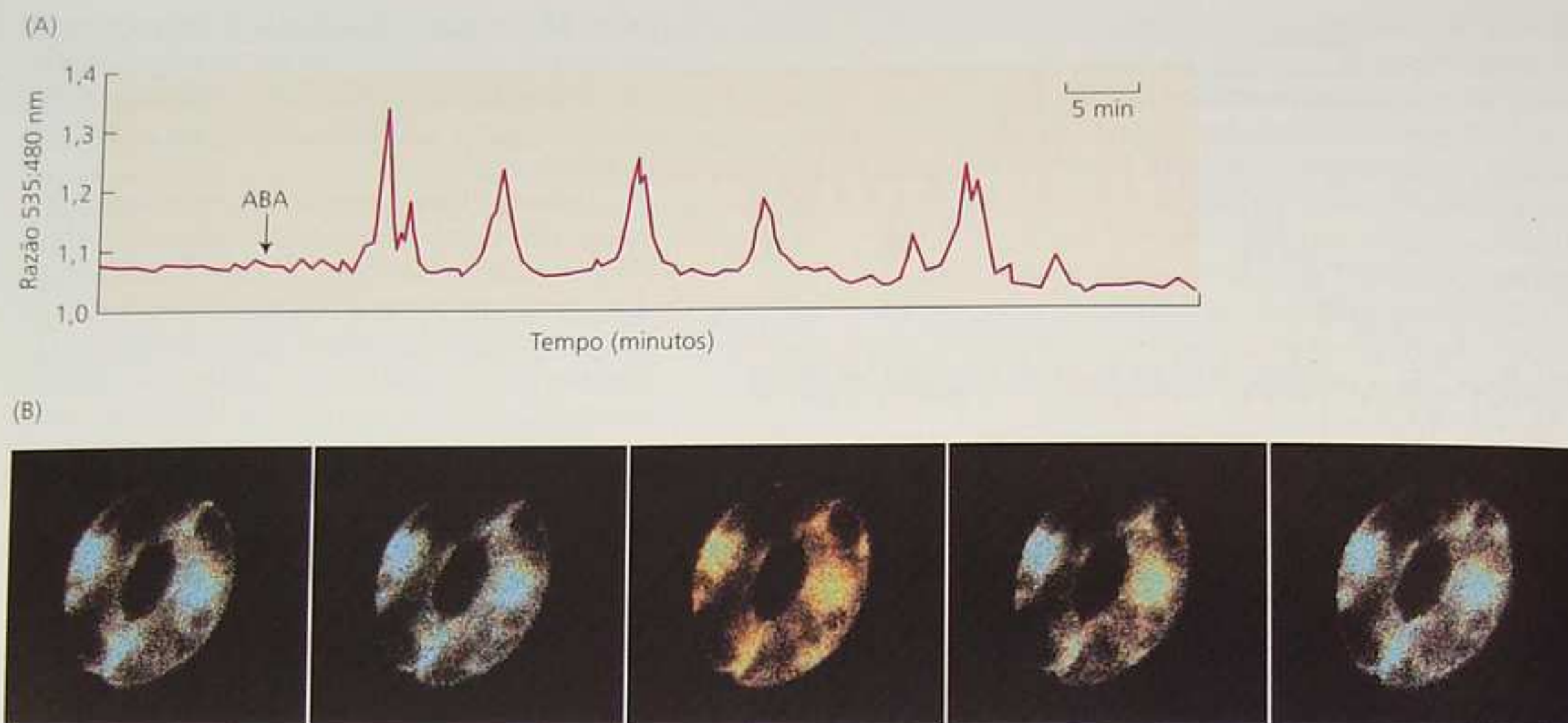



FIGURA 23.10 Oscilações do cálcio induzidas pelo ABA em células guarda de *Arabidopsis* expressando *yellow cameleon*, um corante protéico indicador de cálcio. (A) As oscilações eliciadas pelo ABA são indicadas pelo aumento da razão de emissão de fluorescência em 535 e 480 nm. (B) Imagens de fluorescência pseudocoloridas de células-guarda de *Arabidopsis*. Azul, verde, amarelo e vermelho representam o aumento na concentração do cálcio citosólico (Schroeder e cols., 2001).

bloquear a expressão de uma fosfolipase C induzida pelo ABA, demonstraram que esta enzima é necessária para os efeitos do ABA na germinação, no crescimento e na expressão gênica (Sanchez e Chua, 2001).

A proteína G heterotrimérica pode mediar os efeitos do ABA nos movimentos estomáticos. Por exemplo, muitos estudos em *Vicia faba* indicam que ativadores da proteína G, como o GTPγS, podem inibir a atividade dos canais de influxo do K^+. Coerente com os resultados do inibidor, o ABA não inibe os canais de influxo do K^+ ou a abertura estomática induzida pela luz em mutantes de *Arabidopsis* deficientes na subunidade Gα (Wang e cols., 2001). Contudo, o ABA promove o fechamento estomático nestes mutantes, indicando que a inibição da abertura e a promoção do fechamento utilizam duas rotas distintas para o mesmo resultado final — ou seja, o fechamento estomático.

Foram identificados outros possíveis mensageiros secundários mediadores da resposta do ABA, como o ácido fosfatídico e o *mio*-inositol-hexafosfato (IP_6), mas a relação desses compostos com os sinalizadores IP_3 e o Ca^{2+} ainda não é conhecida.

Todos estes experimentos indicam que as células-guarda respondem a múltiplos sinais, possivelmente envolvendo múltiplos receptores e vias coincidentes de transdução de sinal.

As proteínas quinases e fosfatases participam da ação do ABA

Quase todos os sistemas de sinalização biológica envolvem reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas em alguma etapada rota. Assim, pode-se esperar que a transdução de sinal na célula-guarda, com os seus múltiplos sensores de *input*, envolvem proteínas quinases e fosfatases. A elevação artificial da concentração de ATP dentro das células-guarda, pelo equilíbrio do citoplasma com a solução interna da uma pipeta (ver Capítulo 6), ativa fortemente os canais de ânions tipo *slow*.

Tal ativação dos canais de ânions tipo *slow* pelo ATP á anulada pela inclusão de inibidores da proteína quinase na solução da pipeta (Schmidt e cols., 1995). Os inibidores de proteína quinase também bloqueiam o fechamento estomático induzido pelo ABA. Por outro lado, a diminuição da concentração do ATP no citosol, inativa os canais de ânions tipo *slow*. Além disso, experimentos confirmam que esta inativação deve-se á presença de proteínas fosfatases, as quais removem os grupos fosfatos que estão covalentemente ligados às proteínas. Em vista desses resultados, parece que a fosforilação e a desfosforilação de proteínas desempenham um importante papel na via de transdução de sinal do ABA nas células guarda.

Há evidências de uma proteína quinase ativada pelo ABA (denominada de AAPK) nas células guarda de *Vicia faba* (Li e Assmann, 1996; Mori e Muto, 1997). A atividade da AAPK parece ser necessária para que o ABA ative a corrente iônica tipo-S e o fechamento estomático. Essa enzima é uma proteína quinase de autofosforilação, que tanto faz parte de uma via de transdução de sinal independente do Ca^{2+} quanto atua *downstream* dos eventos de sinalização induzidos pelo cálcio. (A presença de vias para ação do ABA, dependentes e independentes de Ca^{2+}, será discutida breve-

1. Um pulso de luz azul ativa a H^+-ATPase da membrana plasmática, que bombeia prótons para o meio, acidificando o pH.

2. A adição do ABA ao meio de cultura inibe em 40% a acidificação.

3. Os resultados obtidos demonstram que o ABA induz alterações na célula, inibindo a H^+-ATPase da membrana plasmática.

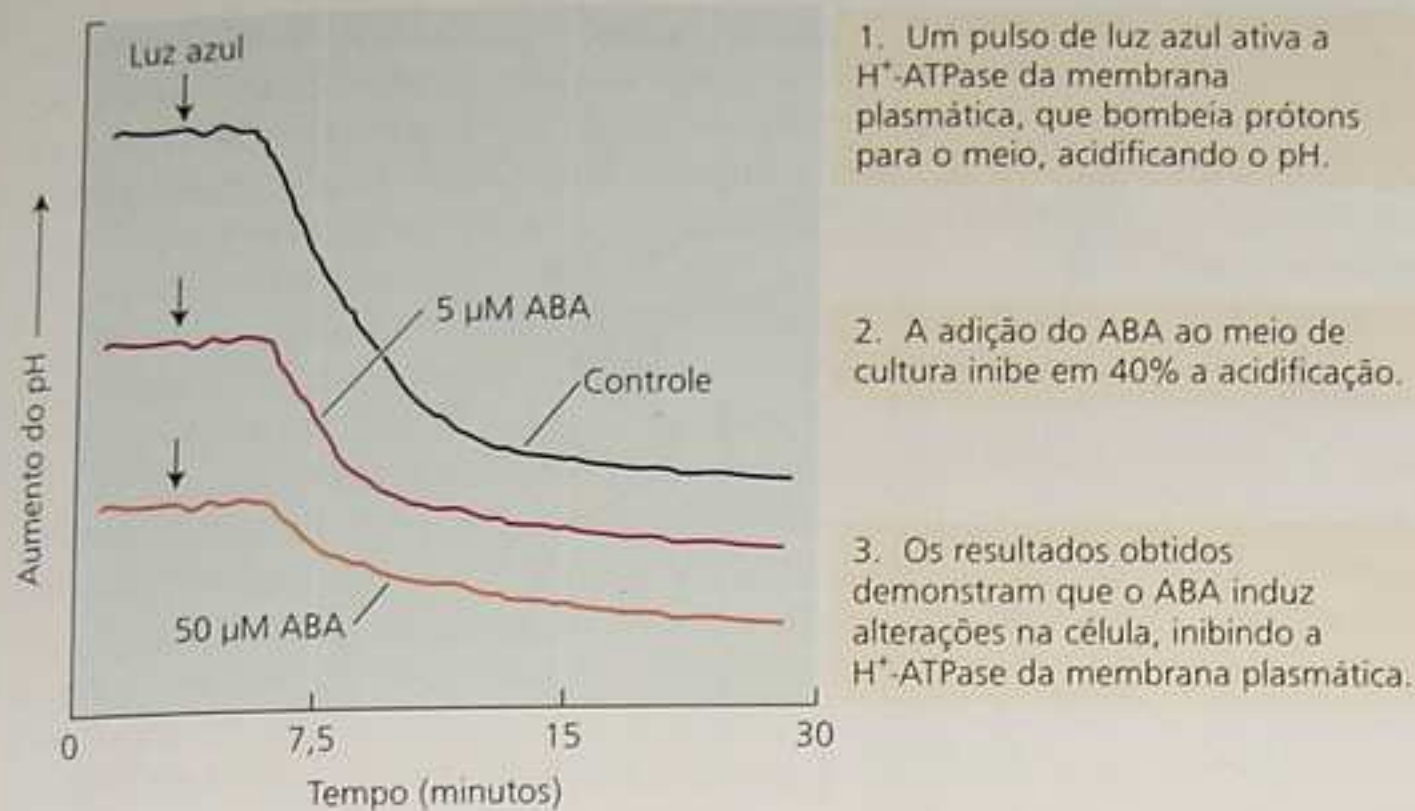



FIGURA 23.11 Inibição pelo ABA das bombas em prótons de protoplastos de células-guarda estimulada pela luz azul. Os protoplastos de células-guarda, em suspensão, foram incubados sob luz vermelha, sendo o pH do meio de suspensão monitorado com um eletrodo de pH. O pH inicial foi o mesmo em todos os casos (as curvas estão deslocadas para facilitar a visualização) (Shimazaki e cols., 1986).

mente.) Além disso, duas proteínas quinase dependentes de Ca^{2+}, além da MAP quinase, têm sido relacionadas com a regulação da abertura estomática pelo ABA.

A análise de mutantes ABA-insensíveis tem auxiliado na identificação de genes codificantes dos componentes da via de transdução de sinal. As mutações *abi1-1* e *abi2-1*, em *Arabidopsis*, resultam na insensibilidade ao ABA tanto nas sementes quanto nas plantas adultas. Esses mutantes *abi* apresentam fenótipos consistentes com o defeito na sinalização do ABA, incluindo a dormência reduzida de sementes, uma tendência a murcha (devido à regulação imprópria da abertura estomática) e o decréscimo na expressão de vários genes induzidos por ABA.

As falhas na resposta dos estômatos incluem a insensibilidade ao ABA dos canais aniônicos tipo-S — ambos canais de efluxo e influxo de K^+ — e a reorganização da actina. Embora não apresente resposta ao ABA, os estômatos mutantes fecharão quando expostos a altas concentrações externas de Ca^{2+}, sugerindo que eles são defectivos na sua capacidade de iniciar a sinalização do Ca^{2+}. Coerente com essa descoberta, o ABA não induz oscilações de Ca^{2+} nesses mutantes (Allen e cols., 1999a).

As proteínas fosfatases ABI são reguladores negativos da resposta ao ABA

Os genes *ABI1* e *ABI2* de *Arabidopsis* foram clonados e identificados como codificantes de duas proteínas fosfatases serina/treonina intimamente relacionadas. Tal descoberta sugere que ABI1 e ABI2 regulam a atividade de proteínas-alvo por desfosforilar resíduos específicos de serina e treonina, mas nenhum dos seus substratos foi efetivamente identificado.

Visto que as mutações *abi1-1* e *abi2-1* resultam no decréscimo da resposta ao ABA, foi suposto inicialmente que os genes do tipo selvagem *promoviam* a resposta ao ABA. No entanto, as mutações originais revelaram-se mais dominantes do que recessivas e os estudos recentes têm demonstrado que elas agem como "dominantes negativos", isto é, uma cópia defectiva de um gene é suficiente para interromper a resposta ao ABA, pela diminuição da atividade dos produtos gênicos funcionais produzidos a partir do alelo selvagem remanescente.

Subseqüentemente, foram obtidos os mutantes recessivos *ABI1* que exibem uma simples perda da atividade *ABI1*. Tais mutantes recessivos de *ABI1* apresentam, na verdade, um aumento na sensibilidade ao ABA (Gosti e cols., 1999). Além disso, a superprodução dos produtos gênicos do tipo selvagem ou de seus homólogos (proteínas intimamente relacionadas) pela reintrodução do gene em plantas, sob controle de um promotor de alta expressão, confere uma sensibilidade *reduzida* ao ABA (Sheen, 1998). Assim, a função destas proteínas fosfatases no tipo selvagem consiste em inibir a resposta ao ABA.

A sinalização do ABA também envolve rotas independentes de Ca^{2+}

Embora um aumento na concentração citosólica do cálcio induzido por ABA seja uma característica-chave no modelo atual para o fechamento da célula-guarda induzido por ABA, o ABA é capaz de induzir o fechamento estomático mesmo em células-guarda que não apresentam aumento do cálcio citosólico (Allan e cols., 1994). Em outras palavras, o ABA parece ser capaz de atuar por meio de uma ou mais vias independentes do cálcio.

Além do cálcio, o ABA pode utilizar o pH citosólico como um sinalizador intermediário. Conforme discutido anteriormente, uma elevação no pH citosólico pode levar à ativação dos canais de efluxo de K^+ e um efeito da mutação *abi1* é conferir a esses canais de K^+ a insensibilidade ao pH. Tal redundância nas vias de transdução de sinal explica como as células-guarda são capazes de integrar uma grande variedade de estímulos hormonais e ambientais que afetam a abertura estomática e essa redundância provavelmente não é específica das células-guarda.

Um modelo geral simplificado para ação do ABA nas células-guarda dos estômatos é apresentado na Figura 23.12. Para facilitar a compreensão, somente os receptores da superfície celular são apresentados.

A regulação da expressão gênica pelo ABA é mediada por fatores de transcrição

Além dos processos iniciais de transdução de sinal do ABA já discutidos, ele promove alterações na expressão gênica. Tem sido demonstrado que o ácido abscísico regula a expressão de numerosos genes durante a maturação da semente e sob certas condições de estresse, tais como choque de calor, adaptação a baixas temperaturas e tolerância ao sal (Rock, 2000). Supõe-se que os genes induzidos pelo ABA ou induzidos pelo estresse contribuam para os aspectos adaptativos da tolerância induzida (ver Capítulo 25). Eles incluem os genes que codificam as proteases, as chaperonas, as proteínas semelhantes às proteínas LEAs, as

1. O ABA liga-se ao seu receptor.

2. A ligação do ABA induz a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais ativam canais de Ca^{2+} da membrana plasmática.

3. O ABA aumenta os níveis do ADP-ribose cíclico e do IP_3, os quais ativam canais de cálcio adicionais no tonoplasto.

4. O influxo do cálcio inicia oscilações de cálcio intracelular e promove a posterior liberação do cálcio dos vacúolos.

5. O aumento do cálcio intracelular bloqueia os canais K^{+}_{in}.

6. O aumento do cálcio intracelular promove a abertura do canal (ânion) Cl^{-}_{out} na membrana plasmática, causando a despolarização da membrana.

7. A bomba de próton da membrana plasmática é inibida pelo aumento do cálcio citosólico induzido pelo ABA e por um aumento intracelular do pH, despolarizando posteriormente a membrana.

8. A despolarização da membrana ativa canais K^{+}_{out}.

9. Para que o K^+ e as ânions saiam através da membrana plasmática, é necessário que sejam primeiro liberados dos vacúolos para o citosol.

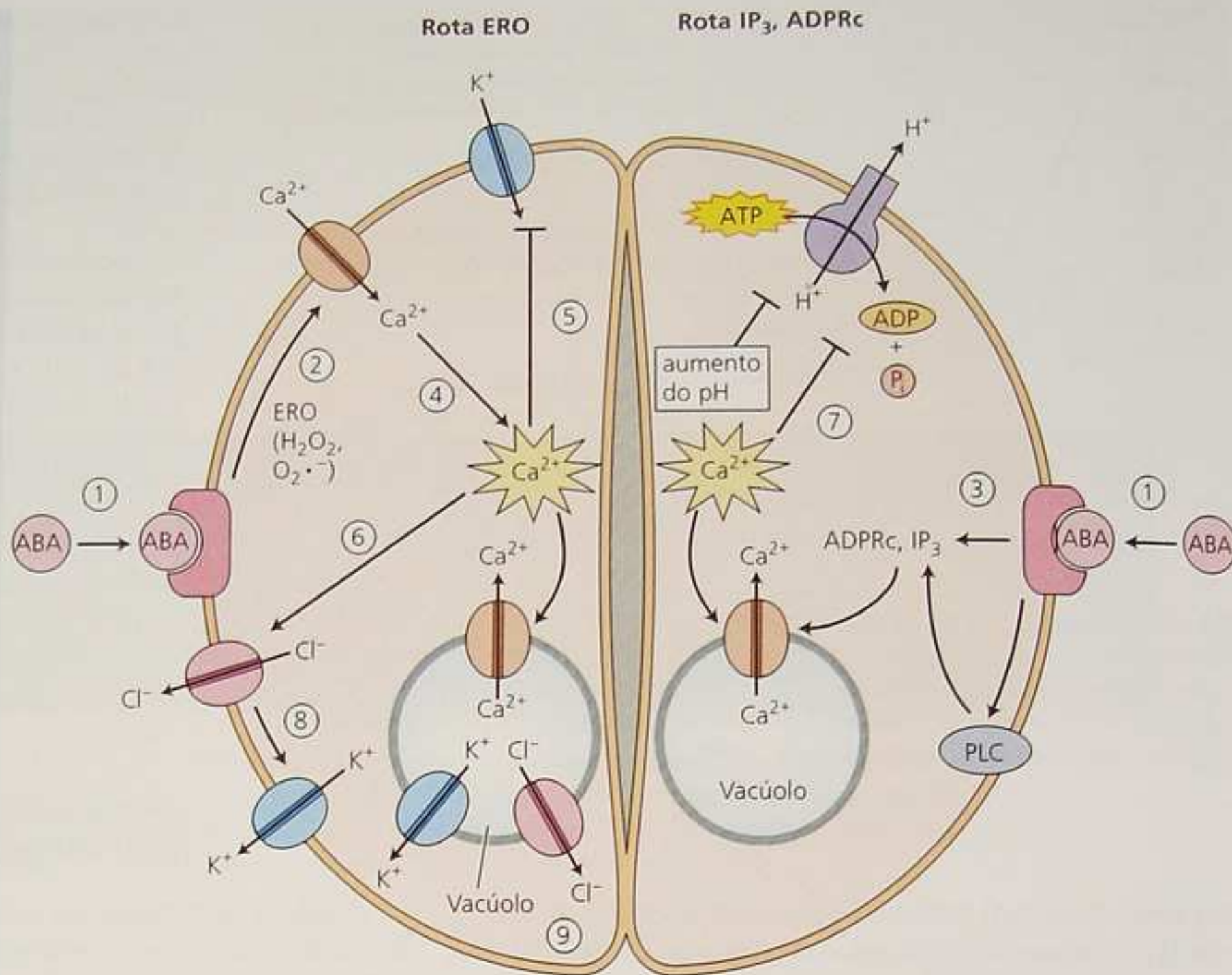



FIGURA 23.12 Modelo simplificado da sinalização do ABA nas células-guarda do estômato. O efeito resultante é a perda do potássio e de seu ânion (Cl^- ou malato^{2-}) da célula. (R = receptor; ERO = espécies reativas de oxigênio; ADPRc = ADP-ribose cíclico; Proteína G = proteína que liga ao GTP; PLC = fosfolipase C.)

enzimas do metabolismo de açúcares ou de outros solutos compatíveis[3], as proteínas de canais de íons e de água, as enzimas que destoxificam espécies ativas de oxigênio e as proteínas reguladoras como os fatores de transcrição e proteínas quinases.

Em alguns casos o estímulo da transcrição pelo ABA tem sido diretamente demonstrado. A ativação gênica pelo ABA é mediada por fatores de transcrição. Quatro classes principais de seqüências reguladoras, que conferem ao ABA a capacidade de indução, foram identificadas e as proteínas que se ligam a essas seqüências foram caracterizadas (ver **Tópico 23.10 na Internet**). Sob condições de estresse, a indução da expressão gênica pode ser dependente ou independente do ABA e fatores adicionais de transcrição, que especificamente intermediam as respostas ao frio, à seca ou a salinidade, têm sido determinados (ver Capítulo 25).

Alguns elementos de DNA envolvidos na repressão transcricional pelo ABA foram identificados. Os elementos mais bem caracterizados são os de resposta à giberelina (ERGA), que atuam como mediadores da expressão induzida por giberelina e são reprimidos pelo ABA, como o gene da α-amilase em cevada (ver Capítulo 20).

Quatro fatores de transcrição envolvendo a ativação gênica pelo ABA em sementes maduras foram determinados utilizando recursos genéticos; mutações nos genes que codificam algumas dessas proteínas reduziram a resposta da semente ao ácido abscísico. Os genes de milho *VP1* (*VIVIPARO-1*) e *Arabidopsis ABI3* (*ABA-INSENSÍVEL3*) codificam proteínas altamente semelhantes, enquanto os genes *ABI4* e *ABI5* codificam membros de duas outras famílias de fatores de transcrição. Os *VP1/ABI3* e o *ABI4* são membros de famílias gênicas encontradas somente em plantas. Em contraste, o *ABI5* é um membro da família do zíper básico de leucina (bZIP), cujos membros estão presentes em todos os eucariontes (Finkelstein e Lynch, 2000).

Outros membros da subfamília *ABI5* têm sido identificados por recursos não-genéticos e estão também correlacionados com a expressão gênica induzida pelo ABA, embriogênese, seca ou estresse salino. A caracterização dos mutantes *vp1*, *abi4* e *abi5* mostrou que cada um desses genes pode ativar ou reprimir a

[3] Um composto orgânico que age como um soluto osmoticamente ativo e não-tóxico no citosol; tais compostos são geralmente acumulados durante o estresse hídrico ou salino (Capítulo 25).

transcrição, dependendo do gene-alvo. Visto que o promotor de um determinado gene possui sítios de ligação para vários receptores, é provável que tais fatores de transcrição atuem em complexos produzidos por várias combinações de reguladores, dos quais a composição é determinada pela combinação dos reguladores disponíveis e dos sítios de ligação.

Até o momento, a proteína ABI3/VP1 parece interagir fisicamente com uma variedade de proteínas, incluindo a ABI5 e seu homólogo em arroz (TRAB1). A ABI5 também forma homodímeros e heterodímeros com outros membros da família bZIP. Há evidências adicionais para interações indiretas, que podem ser mediadas por proteínas 14-3-3, uma classe de proteínas ácidas que dimerizam e facilitam as interações proteína-proteína em uma diversidade de funções de sinalização, de transporte e enzimáticas (ver **Tópico 23.11 na Internet**). Tais estudos demonstram a capacidade de ligação específica entre vários fatores de transcrição que parecem interagir como componentes dos complexos de regulação envolvidos na expressão gênica induzida pelo ABA.

Foram identificados outros reguladores negativos de resposta ao ABA

Conforme foi descrito, identificaram-se reguladores negativos da resposta ao ABA (proteínas fosfatases) pelo isolamento de mutantes dominantes negativos como *abi1* e *abi2*, que resultam em fenótipos ABA-insensíveis (análogo aos efeitos do dominante negativo do receptor mutante do etileno *etr1*; ver Capítulo 22).

Outros reguladores negativos têm sido identificados pelo isolamento de mutantes que exibem aumento da resposta ao ABA. Os mutantes que apresentam o aumento na sensibilidade ao ABA durante a germinação incluem o *era* (do inglês, *e*nhanced *r*esponse to *A*BA) e *abh* (do inglês, *ABA h*ypersensitive) (Cutler e cols., 1996; Hugouvieux e cols., no prelo). Os mutantes *era* e *abh* conferem a hipersensibilidade ao ABA tanto no fechamento estomático quanto na germinação, tornando estes mutantes resistentes ao murchamento e tolerantes a seca moderada.

Farnesil transferase. O gene *ERA1* foi clonado e seu produto protéico, identificado como uma subunidade da enzima farnesil transferase. O farnesil transferase catalisa a ligação do isoprenóide intermediário do farnesil difosfato (ver Capítulo 13) com proteínas que têm uma seqüência-sinal de aminoácidos específica. Muitas proteínas que participam da transdução de sinal têm farnesil. As proteínas com farnesil estão ancoradas à membrana plasmática via interações hidrofóbicas entre o grupo farnesil e os lipídeos da membrana (ver Figura 1.6). A identificação da ERA1 como parte da farnesil transferase sugere que uma proteína, que normalmente inibe a resposta ao ABA, necessita possuir o farnesil e está, provavelmente, ancorada à membrana.

Processamento do mRNA. O *ABH1* codifica uma proteína de ligação ao CAP 5' do mRNA, que pode estar envolvida no processamento do mRNA do regulador negativo da sinalização do ABA (recordar que os RNAs mensageiros dos eucariontes possuem uma seqüência-líder (do inglês, *cap*), que consiste de guanosina metilada na extremidade 5'). A comparação do acúmulo de transcritos nas plantas tipo selvagem e *abh1* indica um pequeno número de genes do mutante que perdem a expressão, incluindo algumas moléculas que possivelmente codificariam sinalizadores.

Insensibilidade ao etileno. Foi descoberto que o *ERA3* é um alelo de um lócus sinalizador do etileno previamente identificado, *ETILENO-INSENSÍVEL2* (*EIN2*) (Ghassemian e cols., 2000) (ver Capítulo 22). Além disso, para exibir a deficiência de resposta ao ABA e ao etileno, as mutações neste gene resultam na deficiência de resposta a auxina, ácido jasmônico e ao estresse. Este gene codifica uma proteína ligada a membrana que parece representar um ponto de "cruzamento" — isto é, um sinalizador intermediário comum — mediando a resposta de muitos sinais diferentes.

Catabolismo do IP3. Outras triagens identificaram mutantes sinalizadores do ABA baseados na expressão incorreta de genes-repórteres controlados por promotores ABA-responsivo. Embora os defeitos em alguns desses mutantes sejam limitados à expressão do gene, outros afetam as respostas de crescimento. Um desses mutantes, denominado *fiery* (*fry*), reflete a intensidade da luz emitida por seu repórter ABA/luciferase estresse-responsivo, que é também hipersensível ao ABA, e a inibição da germinação e crescimento pelo estresse. O gene *FIERY* codifica uma enzima necessária para o catabolismo do IP_3 (Xiong e cols., 2001). O fenótipo mutante demonstra que a capacidade de atenuar, bem como de induzir, a sinalização do estresse é importante para o sucesso da indução da tolerância ao estresse.

Semelhante ao mecanismo de sinalização descrito para outros hormônios vegetais, a sinalização do ABA envolve a ação coordenada de reguladores positivos e negativos que afetam os processos tão diversos quanto à transcrição, o processamento do RNA, a fosforilação de proteínas ou a ligação do farnesil e o metabolismo de mensageiros secundários. Com os componentes de sinalização sendo identificados e freqüentemente encontrados funcionando em resposta a múltiplos sinais, o próximo desafio é determinar como eles podem levar às respostas específicas do ABA.

RESUMO

O ácido abscísico desempenha um importante papel na dormência de sementes e gemas, bem como nas respostas ao estresse hídrico. O ABA é um composto terpenóide de 15 carbonos derivado de uma porção terminal dos carotenos. Nos tecidos, o ácido abscínico pode ser medido por bioensaios de crescimento, germinação ou fechamento estomático. A cromatografia gasosa, CLEA e imunoensaios são os métodos mais confiáveis e precisos disponíveis para medir os níveis do ABA.

A produção do ABA dá-se pela clivagem de um precursor carotenóide de 40 carbonos, sintetizado a partir do isopentenil difosfato via a rota de terpenos do plastídio. O ABA é inativado tanto pela oxidação degradativa quanto pela conjugação.

O ácido abscínico é sintetizado em quase todas as células que possuem plastídios e transportado tanto pelo xilema quanto pelo floema. Os níveis do ABA variam muito em resposta a mudanças no desenvolvimento e no ambiente. Durante a maturação da semente, ocorre um pico de concentração do ABA no período entre as fases intermediária e tardia da embriogênese.

Para o desenvolvimento da tolerância do embrião à dessecação, a síntese de proteínas de reserva, bem como a entrada em dormência o ABA é necessária. A dormência e a germinação da semente são controladas pela razão entre ABA e GA, sendo que os embriões ABA-deficientes podem apresentar germinação pre-

coce e viviparidade. Esse ácido é também antagonizado pelo etileno e brassinosteróides, promovendo a germinação. Embora pouco se saiba com relação ao papel do ABA nas gemas, esse ácido é um dos inibidores que se acumulam nas gemas dormentes.

Durante o estresse hídrico, os níveis do ABA na folha podem ser elevados 50 vezes. Além disso, no fechamento estomático, esse ácido aumenta a condutividade hidráulica da raiz e eleva a razão entre raiz:parte aérea em baixos potenciais hídricos. Considera-se que o ABA e a alcalinização da seiva do xilema sejam dois sinais químicos que as raízes enviam para a parte aérea a fim de sinalizar a falta de água no solo. O aumento do pH da seiva do xilema pode fazer com que mais ABA da folha seja translocado para os estômatos pela corrente de transpiração.

O ABA exerce tanto um controle breve quanto um controle mais prolongado do desenvolvimento vegetal. Os efeitos de um controle mais prolongado são mediados pela expressão de genes induzidos pelo ABA, o qual estimula a síntese de muitas classes de proteínas durante o desenvolvimento da semente e durante o estresse hídrico, incluindo a família LEA, proteases e chaperonas, canais de água e íons e enzimas que catalisam o metabolismo de solutos compatíveis ou destoxificam espécies ativas de oxigênio. Essas proteínas podem proteger as membranas e outras proteínas do dano causado pela dessecação, ou podem auxiliar na recuperação dos efeitos prejudiciais do estresse. Foram identificados elementos que respondem ao ABA, bem como fatores de transcrição que se ligam a ele. O ABA também inibe a expressão de genes induzidos pelo GA — por exemplo, a síntese do GA-MYB e α-amilase da camada de aleurona de cevada.

Há evidências tanto para receptores extracelulares quanto para intracelulares nas células-guarda. O ABA fecha os estômatos causando uma longa despolarização da membrana plasmática da célula-guarda. Acredita-se que a despolarização é causada por um aumento no Ca^{2+} citosólico, bem como pela alcalinização do citosol. O aumento no cálcio citosólico decorre da combinação da absorção do cálcio e da liberação do cálcio das reservas internas. Esse aumento no cálcio conduz à abertura de canais de ânions tipo *slow*, o que resulta na despolarização da membrana. O IP_3, IP_6, ADPRc, PA e espécies reativas de oxigênio, funcionam como mensageiros secundários nas células-guarda tratadas com o ABA, sendo que a proteína G faz parte destas respostas. A abertura dos canais de efluxo do K^+ em resposta à despolarização da membrana e à elevação do pH, promovem um efluxo massivo do K^+.

Em geral, as respostas ao ABA parecem ser reguladas por mais de uma via de transdução de sinal, mesmo em um único tipo de célula. Essa redundância é coerente com a capacidade das células vegetais em responderem a múltiplos estímulos sensoriais. Existem evidências genéticas para o "cruzamento" entre a via de sinalização do ABA e a via de sinalização de outras classes de fito-hormônios, bem como de açúcares.

Material da Internet

Tópicos da Internet

23.1 A estrutura do ácido lunulárico das hepáticas
Embora não desempenhe atividade nos vegetais superiores, o ácido lunulárico das hepáticas parece ter efeito semelhante ao ABA.

22.2 Requisitos estruturais para a atividade biológica do ABA
Para ser ativo como hormônio, o ABA necessita certos grupos funcionais.

22.3 Bioensaio do ABA
Vários tecidos que respondem ao ABA são utilizados para detectá-lo e quantificá-lo.

22.4 Proteínas necessárias para a tolerância à dessecação
O ABA induz a síntese de proteínas que protege as células dos danos decorrentes da dessecação.

22.5 Tipos de dormência das sementes e o papel dos fatores ambientais
Esta discussão amplia os vários tipos de dormência e descreve como os fatores ambientais afetam a dormência.

22.6 A longevidade das sementes
Sob certas condições, as sementes podem permanecer dormentes por centenas de anos.

23.7 Mapeamento genético da dormência: contagem de locus de características quantitativas (QTL) da dormência vegetativa combinada com uma abordagem do gene candidato
É descrito um método genético para determinar o número e a localização no cromossomo, de genes que afetam uma característica quantitativa influenciada por vários genes não-ligados.

23.8 O ABA induz a senescência e o etileno
Mutantes hormônio-insensíveis têm possibilitado distinguir os efeitos do etileno e do ABA na senescência.

23.9 *Yellow cameleon*: Uma ferramenta não-invasiva para medir o cálcio intracelular
São descritas as características da proteína *yellow cameleon* que fazem com que ela aja como um repórter para as concentrações de cálcio.

23.10 Elementos promotores que regulam a expressão gênica induzida pelo ABA
É apresentada uma tabela com diferentes elementos de resposta ao ABA.

23.11 Sistema duplo-híbrido
O fator de transcrição GAL4 pode ser utilizado para detectar interações proteína-proteína em leveduras.

Ensaio da Internet

23.1 Heterofilia em plantas aquáticas
O ácido abscísico induz a morfologia foliar do tipo aéreo em muitas plantas aquáticas.

Referências bibliográficas

Allan, A. C., Fricker, M. D., Ward, J. L., Beale, M. H., and Trewavas, A. J. (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6:1319-1328.

Allen, G. J., Kuchitsu, K., Chu, S. P, Murata, Y., and Schroeder, J. I. (1999a) *Arabidopsis* abil-1 and abi2-1 phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* 11: 1785-1798.

Allen, G. J., Kwak, J. M., Chu, S. P, Llopis, J., Tsien, R. Y, Harper, J. E, and Schroeder, J. I. (1999b) Cameleon calcium indicator reports cytoplasmic calcium dynamics in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 19:735-747.

Anderson, B. E., Ward, J. M., and Schroeder, J.1. (1994) Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiol.* 104: 1177-1183.

Beardsell, M. F., and Cohen, D. (1975) Relationships between leaf water status, abscisic acid levels, and stomatal resistance in maize and sorghum. *Plant Physiol.* 56: 207-212.

Bewley, J. D., and Black, M. (1994) *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2nd ed. Plenum, New York.

Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney S., and McCourt, P (1996) A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Science* 273: 1239-1241.

Davies, P J., ed. (1995) *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Davies, W. J., and Zhang, J. (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 55-76.

Finkelstein, R. R., and Lynch, T. J. (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene AB15 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.

Finkelstein, R. R., Wang, M. L., Lynch, T. J., Rao, S., and Goodman, H. M. (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus AB14 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.

Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y, and McCourt, P (2000) Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117-1126.

Gilroy S., and Jones, R. L. (1994) Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104: 1185-1192.

Gilroy S., Read, N. D., and Trewavas, A. J. (1990) Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged inositol trisphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 343: 769-771.

Gomez-Cadenas, A., Zentella, R., Walker-Simmons, M. K., and Ho, T.-H. D. (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABAI in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* 13: 667-679.

Gosti, E, Beaudoin, N., Serizet, C., Webb, A. A. R., Vartanian, N., and Giraudat, J. (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* 11: 1897-1909.

Grabov, A., Leung, J., Giraudat, J., and Blatt, M. (1997) Alteration of anion channel kinetics in wild-type and *abil-1* transgenic *Nicotiana benthamiana* guard cells by abscisic acid. *Plant J.* 12: 203-213.

Hoecker, U., Vasil, 1. K., and McCarty, D. R. (1995) Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes Dev.* 9: 2459-2469.

Hugouvieux, V, Kwak, J. M., and Schroeder, J. I. (In press) A mRNA cap binding protein, ABHl, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell*.

Jeannette, E., Rona, J.-P, Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B., and Miginiac, E. (1999) Induction of *RA B18* gene expression and activation of K+ outward rectifying channels depend on an extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant J.*18: 13-22.

Kinoshita, T., Nishimura, M., and Shimazaki, K.-I. (1995) Cytosolic concentration of Ca2+ regulates the plasma membrane H+ATPase in guard cells of fava bean. *Plant Cell* 7: 1333-1342.

Koornneef, M., Jorna, M. L., Brinkhorst-van der Swan, D. L. C., and Karssen, C. M. (1982) The isolation of abscisic acid (ABA) deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of *Arabidopsis thaliana* L. *Heynh. Theor. Appl. Genet.* 61: 385-393.

Lee, Y, Choi, Y B., Suh, S., Lee, J., Assmann, S. M., Joe, C. O., Kelleher, J. E, and Crain, R. C. (1996) Abscisic acid-induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Plant Physiol.* 110: 987-996.

Li, J., and Assmann, S. M. (1996) An abscisic acid-activated and calcium-independent protein kinase from guard cells of fava bean. *Plant Cell* 8: 2359-2368.

Mansfield, T. A., and McAinsh, M. R. (1995) Hormones as regulators of water balance. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., P J. Davies, ed., Kluwer, Dordrecht, Netherlands, pp. 598-616.

Milborrow, B. V (2001) The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: A review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 52: 1145-1164.

Mori, I. C., and Muto, S. (1997) Abscisic acid activates a 48-kilodalton protein kinase in guard cell protoplasts. *Plant Physiol.* 113: 833-839.

Nambara, E., Hayama, R., Tsuchiya, Y, Nishimura, M., Kawaide, H., Kamiya, Y, and Naito, S. (2000) The role of *abi3* and fus3 loci in *Arabidopsis thaliana* on phase transition from late embryo development to germination. *Dev. Biol.* 220: 412-423.

Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., and Hancock, J. T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128: 13-16.

Pei, Z.-M., Kuchitsu, K., Ward, J. M., Schwarz, M., and Schroeder, J.1. (1997) Differential abscisic acid regulation of guard cell slow anion channels in *Arabidopsis* wild-type and abil and abi2 mutants. *Plant Cell* 9: 409-423.

Pei, Z. M., Murata, Y, Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G. J., Grill, E., and Schroeder, J. I. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406: 731-734.

Raz, V., Bergervoet, J. H. W., and Koornneef, M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development* 128: 243-252.

Rock, C. D. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytol.* 148: 357-396.

Saab, I. N., Sharp, R. E., Pritchard, J., and Voetberg, G. S. (1990) Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant Physiol.* 93: 1329-1336.

Sanchez, J.-P, and Chua, N.-H. (2001) *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13: 1143-1154.

Schmidt, C., Schelle, I., Liao, Y-J., and Schroeder, J. I. (1995) Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9535-9539.

Schroeder, J. L, and Hagiwara, S. (1990) Repetitive increases in cystolic Caz+ of guard cells by abscisic acid activation of nonselective Ca2+ permeable channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9305-9309.

Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V, Kwak, J. M., and Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.

Schultz, T. F., and Quatrano, R. S. (1997) Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Sci.* 130: 63-71.

Schurr, U., Gollan, T., and Schulze, E.-D. (1992) Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus. II.* Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. *Plant Cell Environ.* 15: 561-567.

Schwartz, A., Ilan, N., Schwartz, M., Scheaffer, J., Assmann, S. M., and Schroeder, J. I. (1995) Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiol.* 109: 651-658.

Capítulo

24 O controle do florescimento

MUITAS PESSOAS AGUARDAM ANSIOSAMENTE a primavera e a profusão de flores que ela traz. Alguns planejam cuidadosamente suas férias de forma a coincidir com estações específicas de floração: *Citrus* ao longo da Blossom Trail no sul da Califórnia, tulipas na Holanda. Em Washington e no Japão, as florações das cerejeiras são festejadas com animadas cerimônias. Com a progressão da primavera em direção ao verão, deste em direção ao outono e dele em direção ao inverno, as flores silvestres florescem em seu devido tempo.

Embora a forte correlação entre o florescimento e as estações seja de domínio comum, o fenômeno traz questões fundamentais que serão consideradas neste capítulo:

- Como as plantas acompanham o curso do desenvolvimento das estações do ano e das horas do dia?
- Que sinais ambientais controlam o florescimento e como eles são percebidos?
- Como os sinais ambientais são traduzidos de forma a iniciar as alterações de desenvolvimento associadas ao florescimento?

No Capítulo 16 foi discutido o papel dos meristemas apicais da raiz e do caule no crescimento e desenvolvimento vegetativos. A transição para o florescimento envolve grandes alterações no padrão de morfogênese e diferenciação celular no meristema apical do caule. Em última análise, este processo leva à produção de órgãos florais — sépalas, pétalas, estames e carpelos (ver **Figura 1.2.A, Tópico 1.2 na Internet**).

Células especializadas na antera passam por meiose para produzir quatro micrósporos haplóides que se desenvolvem nos grãos de pólen. Da mesma forma, uma célula dentro do rudimento seminal divide-se meioticamente, produzindo quatro megásporos haplóides, um dos quais sobrevive, passa por três divisões mitóticas e origina as células do saco embrionário (ver **Figura 1.2.B, Tópico 1.2 na Internet**), o qual representa o gametófito feminino maduro. O grão de pólen, com o seu tubo polínico germinado, é a geração do gametófito masculino maduro. Ambas estruturas gametofíticas produzem gametas (oosfera e células espermáticas), as quais se fundem para formar o zigoto diplóide, o primeiro estádio da nova geração esporofítica.

Claramente, as flores representam um conjunto complexo de estruturas funcionalmente especializadas, que diferem de modo substancial do corpo vegetativo da planta na forma e nos tipos celulares. Assim, a transição para o florescimento proporciona alterações radicais no destino das células dentro do meristema apical da parte aérea. Na primeira parte deste capítulo, serão discutidas tais alterações, as quais se manifestam como *desenvolvimento floral*. Recentemente, foram identificados genes com funções muito importantes na formação dos órgãos florais. Estes estudos trouxeram nova luz sobre o controle genético do desenvolvimento reprodutivo das plantas.

Os eventos que ocorrem no ápice do caule e que forçam o meristema apical a produzir *flores* são coletivamente chamados de **evocação floral.** Na segunda parte deste capítulo, serão analisados os eventos que levam à evocação floral. Os sinais de desenvolvimento que resultam na evocação floral incluem fatores endógenos, tais como *ritmo circadiano, mudança de fase* e *hormônios*, e fatores externos, como o comprimento do dia (*fotoperíodo*) e a temperatura (*vernalização*). No caso do fotoperiodismo, sinais transmissíveis das folhas, chamados coletivamente de **estímulo floral,** são transferidos para o meristema apical do caule. As interações de tais fatores endógenos e externos capacitam a planta a sincronizar seu desenvolvimento reprodutivo com o ambiente.

MERISTEMAS FLORAIS E DESENVOLVIMENTO DE ÓRGÃOS FLORAIS

Os meristemas florais podem em geral ser distinguidos dos meristemas vegetativos pelo seu tamanho maior, mesmo nos estádios iniciais de desenvolvimento reprodutivo. A transição de desenvolvimento vegetativo para reprodutivo é marcada por um aumento na freqüência de divisões celulares dentro da zona central do meristema apical do caule. No meristema vegetativo, as células da zona central completam lentamente seus ciclos de divisão. Quando inicia o desenvolvimento reprodutivo, o aumento no tamanho dos meristemas é, em grande parte, um resultado do aumento da taxa de divisão celular destas células centrais. Recentemente, estudos genéticos e moleculares identificaram uma rede de genes que controlam a morfogênese floral em *Arabidopsis*, *Antirrhinum* e outras espécies.

Nesta seção, será enfocado o desenvolvimento floral em *Arabidopsis*, o qual tem sido estudado extensivamente (Figura 24.1). De início serão delineadas as alterações morfológicas básicas que ocorrem durante a transição da fase vegetativa para a reprodutiva. Em seguida, serão considerados o arranjo dos órgãos florais em quatro verticilos no meristema, assim como os tipos de genes que governam o padrão normal de desenvolvimento floral. De acordo com o modelo ABC (descrito na Figura 24.6) amplamente aceito, as localizações específicas dos órgãos florais dentro da flor são regulados pela expressão sobreposta de três tipos de genes de identidade de órgãos florais.

As características dos meristemas do caule em *Arabidopsis* mudam com o desenvolvimento

Durante a fase de crescimento vegetativo, o meristema apical vegetativo de *Arabidopsis* produz fitômeros com entrenós muito curtos, resultando em uma roseta de folhas basais (ver Figura 24.1A). (Lembrar-se do Capítulo 16: um fitômero consiste de uma folha, o nó ao qual ela esta ligada, a gema axilar e o entrenó abaixo do nó.)

Quando as plantas iniciam o desenvolvimento reprodutivo, o meristema vegetativo é transformado em um **meristema primário de inflorescência**, o que produz meristemas florais em seus flancos (Figura 24.2). As gemas laterais das folhas caulinares (folhas da inflorescência) desenvolvem-se em **meristemas secundários de inflorescência**, e sua atividade repete o padrão de desenvolvimento do meristema primário de inflorescência, conforme mostrado na Figura 24.1A.

(A)

Flor

Inflorescência secundária

Inflorescência primária

Folha

Folha da roseta

(B)

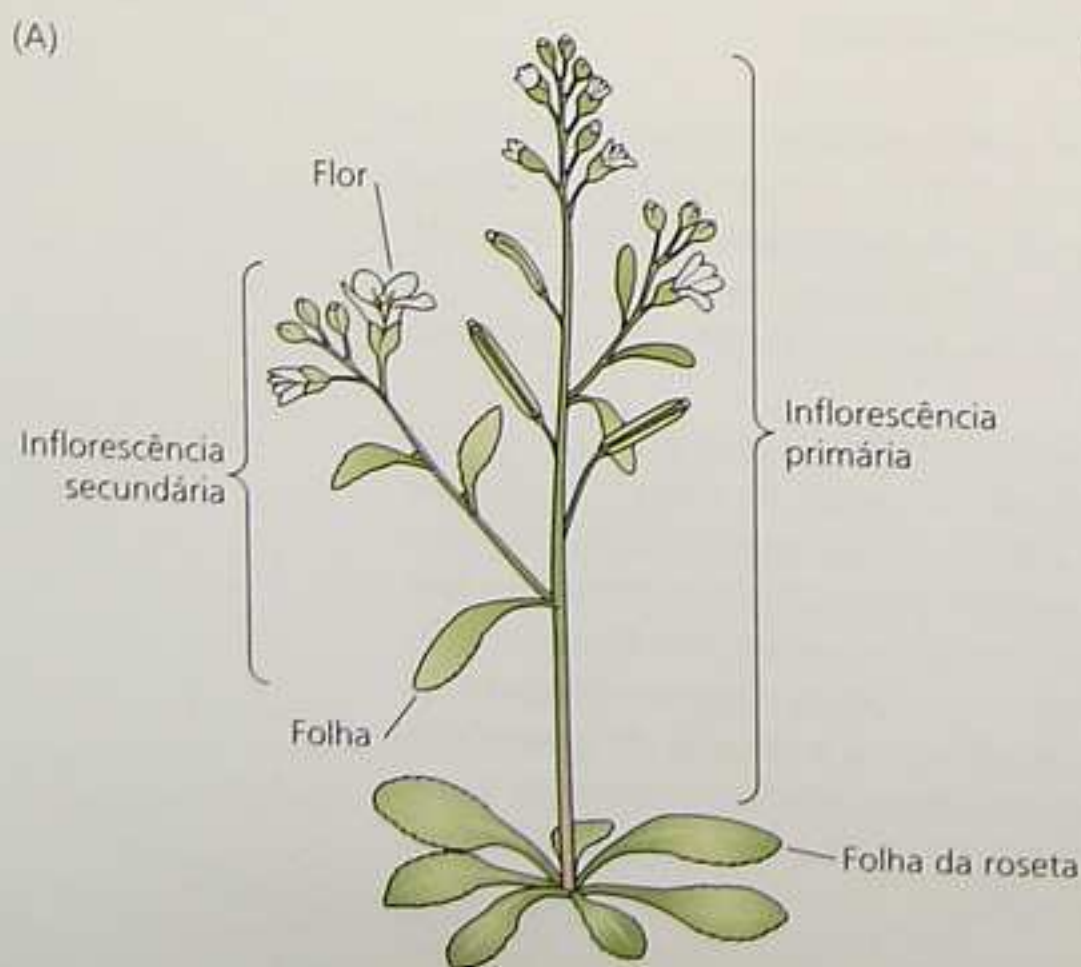



FIGURA 24.1 (A) O meristema apical do caule de *Arabidopsis thaliana* gera órgãos distintos em diferentes estádios de desenvolvimento. Cedo durante o desenvolvimento o meristema apical do caule forma uma roseta de folhas basais. Quando a planta faz a transição para o florescimento, o meristema apical do caule é transformado em um meristema primário de inflorescência que, em última análise, produz um caule alongado contendo flores. Os primórdios foliares iniciados antes da transição floral tornam-se folhas caulinares e inflorescências secundárias desenvolvem-se nas axilas das folhas caulinares. (B) Fotografia de uma planta de *Arabidopsis* (cedida por Richard Amasino).

(A)

(B)

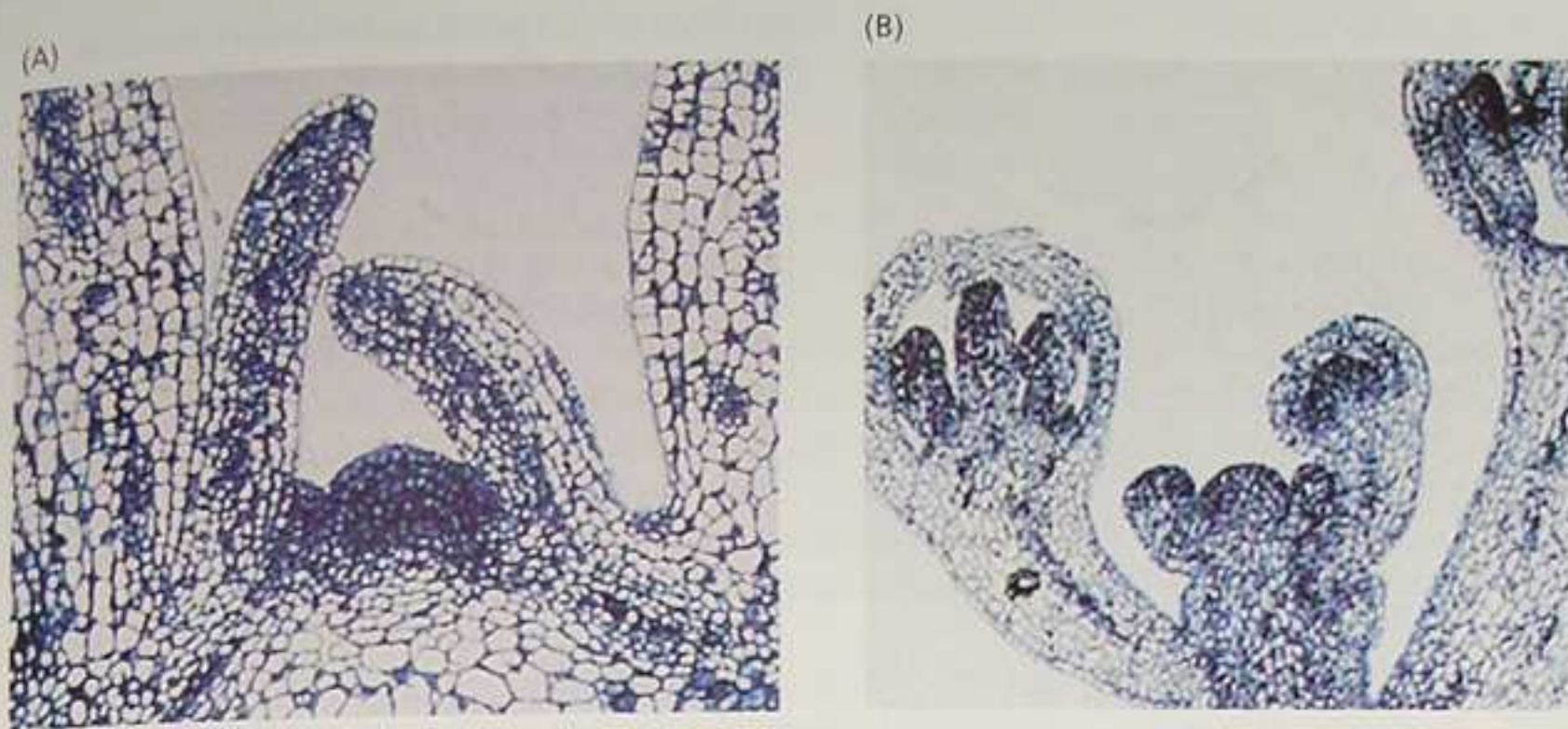



FIGURA 24.2 Seções longitudinais da região apical do caule vegetativo (A) e reprodutivo (B) de *Arabidopsis* (cedidas por V. Grbic´ e M. Nelson).

Os quatro diferentes tipos de órgãos florais são iniciados como verticilos separados

Os meristemas florais dão início a quatro diferentes tipos de órgãos florais: sépalas, pétalas, estames e carpelos (Coen e Carpenter, 1993). Tais conjuntos de órgãos são iniciados em círculos concêntricos denominados **verticilos**, ao redor dos flancos do meristema (Figura 24.3). A iniciação dos órgãos mais internos, os carpelos, consome todas as células meristemáticas no domo apical, sendo que apenas os primórdios dos órgãos florais estão presentes quando a gema floral se desenvolve. Na flor do tipo selvagem de *Arabidopsis*, os verticilos estão arranjados da seguinte forma:

- O primeiro verticilo (mais externo) consiste de quatro sépalas, que são verdes quando maduras.
- O segundo é composto de quatro pétalas, que são brancas quando maduras.
- O terceiro contém seis estames, dos quais dois são menores que os outros.
- O quarto verticilo é um único órgão complexo, o gineceu ou pistilo, o qual é composto de um ovário com dois carpelos fundidos, cada um contendo numerosos rudimentos seminais, e um estilete curto terminando em um estigma (Figura 24.4).

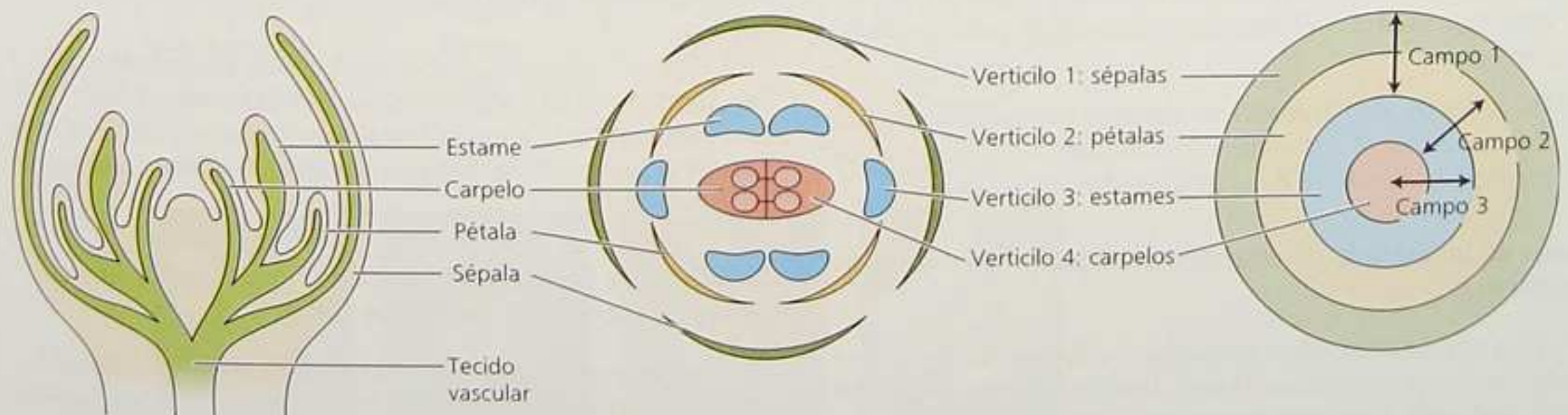



FIGURA 24.3 Os órgãos florais são iniciados seqüencialmente pelo meristema floral, conforme mostrado em *Arabidopsis*. (A e B) Os órgãos florais são produzidos como sucessivos verticilos (círculos concêntricos), iniciando com as sépalas e progredindo para dentro. (C) De acordo com o modelo combinatório, as funções de cada verticilo são determinadas por campos de desenvolvimento sobrepostos, os quais correspondem ao padrão de expressão de genes específicos de identidade de órgãos florais (Bewley e cols., 2000).

(A) (B)

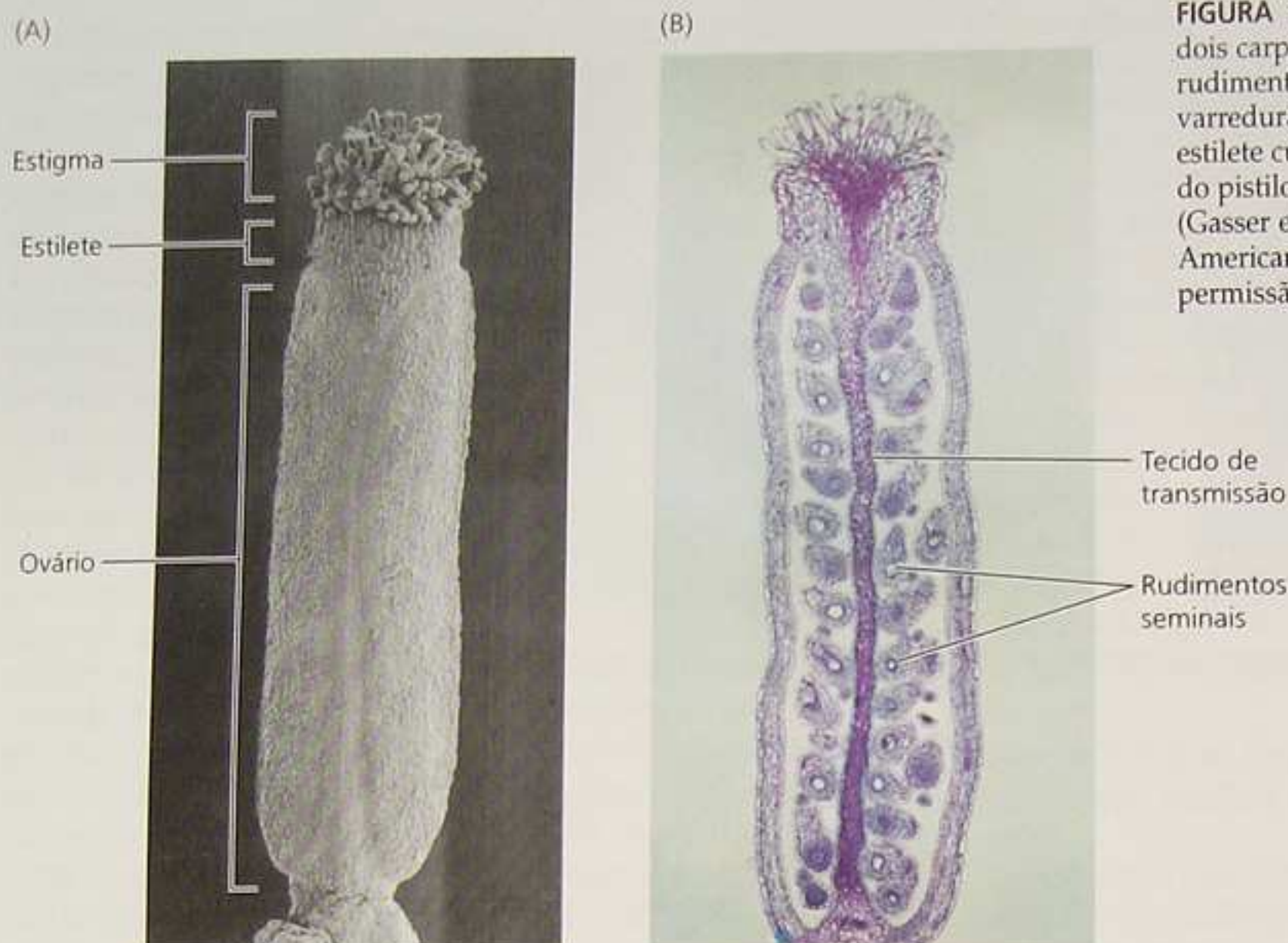



FIGURA 24.4 O pistilo de *Arabidopsis* consiste de dois carpelos fundidos, cada um contendo muitos rudimentos seminais. (A) Electromicrografia de varredura de um pistilo, mostrando o estigma, um estilete curto e o ovário. (B) Seção longitudinal através do pistilo, mostrando os vários rudimentos seminais (Gasser e Robinson-Beers, 1993, cedidas C.S.Gasser, à American Society of Plant Biologists, impresso com permissão).

Três tipos de genes regulam o desenvolvimento floral

Três classes de genes que regulam o desenvolvimento floral foram identificadas por mutações: genes de identidade de órgãos florais, genes cadastrais e genes de identidade de meristemas.

1. Os **genes de identidade de órgãos florais** controlam diretamente a identidade floral. As proteínas codificadas por estes genes são fatores de transcrição que provavelmente controlam a expressão de outros genes, cujos produtos estão envolvidos na formação e/ou função dos órgãos *florais*.
2. Os **genes cadastrais** atuam como reguladores espaciais dos genes de identidade de órgãos florais, definindo os limites da sua expressão (a palavra *cadastro* refere-se a um mapa ou pesquisa que mostra os limites das propriedades para fins de taxação).
3. Os **genes de identidade de meristemas** são necessários para a indução inicial dos genes de identidade de órgãos. São os reguladores positivos da identidade de órgãos florais.

Genes de identidade de meristemas regulam a função dos meristemas

Para que os primórdios formados nos flancos do meristema apical tornem-se meristemas florais (lembrar que um meristema apical que esteja formando meristemas florais em seus flancos é conhecido como um meristema de inflorescência) é necessário que os genes de identidade de meristemas estejam ativos. Por exemplo, mutantes de *Anthirrinum* (boca-de-leão) com um defeito no gene de identidade de meristema *FLORICAULA* desenvolvem uma inflorescência que não produz flores. Em vez de determinar a formação de meristemas florais nas axilas das brácteas, o gene mutante *floricaula* resulta no desenvolvimento de meristemas adicionais de inflorescência nas axilas das brácteas. O gene tipo selvagem *floricaula* (*FLO*) controla a etapa de determinação, na qual é estabelecida a identidade do meristema floral.

Em *Arabidopsis*, os genes *AGAMOUS-LIKE 20*[1] (*AGL20*), *APETALA1* (*AP1*) e *LEAFY* (*LFY*) são críticos na rota genética que necessita ser ativada para estabelecer a identidade do meristema floral. O *LFY* é em *Arabidopsis* a versão do gene *FLO* do *Anthirrinum*. O *AGL20* tem um papel central na evocação floral, integrando os sinais de várias rotas diferentes envolvendo tanto estímulos ambientais quanto internos (Borner e cols., 2000). Assim, o *AGL20* parece servir como uma chave geral para iniciar o desenvolvimento floral.

Uma vez ativado, o *AGL20* desencadeia a expressão do *LFY* e este, por sua vez, dá início à expressão do *AP1* (Simon e cols., 1996). Em *Arabidopsis*, o *LFY* e o *AP1* estão envolvidos em um circuito de *feedback* positivo; isto é, a expressão do *AP1* também estimula a expressão do *LFY*.

As mutações homeóticas levaram à identificação dos genes de identidade de órgãos florais

Os genes que determinam a identidade dos órgãos florais foram descobertos como **mutantes homeóticos florais** (ver **Capítulo 14 na Internet**). Conforme discutido no Capítulo 14, mutações

[1]Também conhecido como *supressor da superexpressão de constantes 1* (*SOC1*).

na mosca da fruta, *Drosophila*, levaram à identificação de um conjunto de genes homeóticos codificadores de fatores de transcrição, os quais determinam a localização na qual estruturas específicas se desenvolvem. Tais genes atuam como importantes controladores do desenvolvimento, que ativam todo o programa genético para uma determinada estrutura. Assim, a expressão dos genes homeóticos confere identidade aos órgãos.

Como já foi visto neste capítulo, flores de dicotiledôneas consistem de verticilos sucessivos de órgãos que se formam como resultado da atividade de meristemas florais: sépalas, pétalas, estames e carpelos. Estes órgãos são produzidos na época e local em que se encontram, devido à expressão padronizada e ordenada, assim como às interações de um pequeno grupo de genes homeóticos que especificam a identidade de órgãos florais.

Os genes de identidade de órgãos florais foram identificados por meio de mutações homeóticas, as quais alteraram a identidade de órgãos florais de tal modo que alguns deles apareceram no lugar errado. Por exemplo, plantas de *Arabidopsis* com mutações no gene *APETALA2* (*AP2*) produzem flores com carpelos onde deveria haver pétalas e estames onde as pétalas normalmente aparecem.

Os genes homeóticos clonados até o momento codificam fatores de transcrição — proteínas que controlam a expressão de outros genes. Muitos dos genes homeóticos das plantas pertencem a uma classe de seqüências relacionadas conhecidas como **genes MADS *box***, enquanto os genes homeóticos animais contêm seqüências chamadas *homeoboxes* (ver **Capítulo 14 na Internet**).

Muitos dos genes que determinam a identidade de órgãos florais são MADS *box*, incluindo o *DEFICIENS do Anthirrinum* e os genes *AGAMOUS*, *PISTILLATA1* e *APETALA3* de *Arabidopsis*. Os genes MADS *box* partilham uma característica, uma seqüência de nucleotídeos conservada conhecida como uma MADS *box*, que codifica uma estrutura protéica conhecida de *domínio MADS*, o qual permite que estes fatores de transcrição liguem-se ao DNA que possui uma seqüência específica de nucleotídeos.

Nem todos os genes que contêm o domínio MADS *box* são homeóticos. Por exemplo, o *AGL20* é um gene MADS *box*, mas funciona como um gene de identidade de meristemas.

Três tipos de genes homeóticos controlam a identidade dos órgãos florais

Sabe-se que cinco diferentes genes especificam a identidade de órgãos florais em *Arabidopsis*: *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*), e *AGAMOUS* (*AG*) (Bowman e cols., 1989; Weigel e Meyerowitz, 1994). Os genes de identidade floral foram inicialmente identificados por mutações que alteram drasticamente a estrutura e, por conseqüência, a identidade dos órgãos florais produzidos em dois verticilos adjacentes (Figura 24.5). Por exemplo, plantas com a mutação *ap2* não têm sépalas ou pétalas (ver Figura 24.5B). Plantas com a mutação *ap3* ou *pi* produzem sépalas em vez de pétalas no segundo verticilo e carpelos em vez de estames no terceiro verticilo (ver Figura 24.5C). As plantas homozigotas para a mutação *ag* não apresentam estames ou carpelos (ver Figura 24.5D).

Pelo fato de as mutações nestes genes alterarem a identidade dos órgãos florais sem afetar a iniciação das flores, eles são genes homeóticos, os quais caem em três classes — tipos A, B e C — definindo três tipos diferentes de atividades (Figura 24.6):

1. A atividade tipo A, codificada por *AP1* e *AP2*, controla a identidade dos órgãos no primeiro e segundo verticilos. A perda da atividade tipo A resulta na formação de carpelos, em vez de sépalas, no primeiro verticilo e de estames, em vez de pétalas, no segundo.
2. A atividade tipo B, codificada por *AP3* e *PI*, controla a determinação dos órgãos no segundo e terceiro verticilos. A perda da atividade tipo B resulta na formação de sépalas, em vez de pétalas no segundo verticilo, e de carpelos no lugar de estames no terceiro.

(A) (B) (C) (D)

Estame
Carpelo
Pétala
Sépala

Tipo selvagem | *apetala2-2* | *pistillata2* | *agamous1*

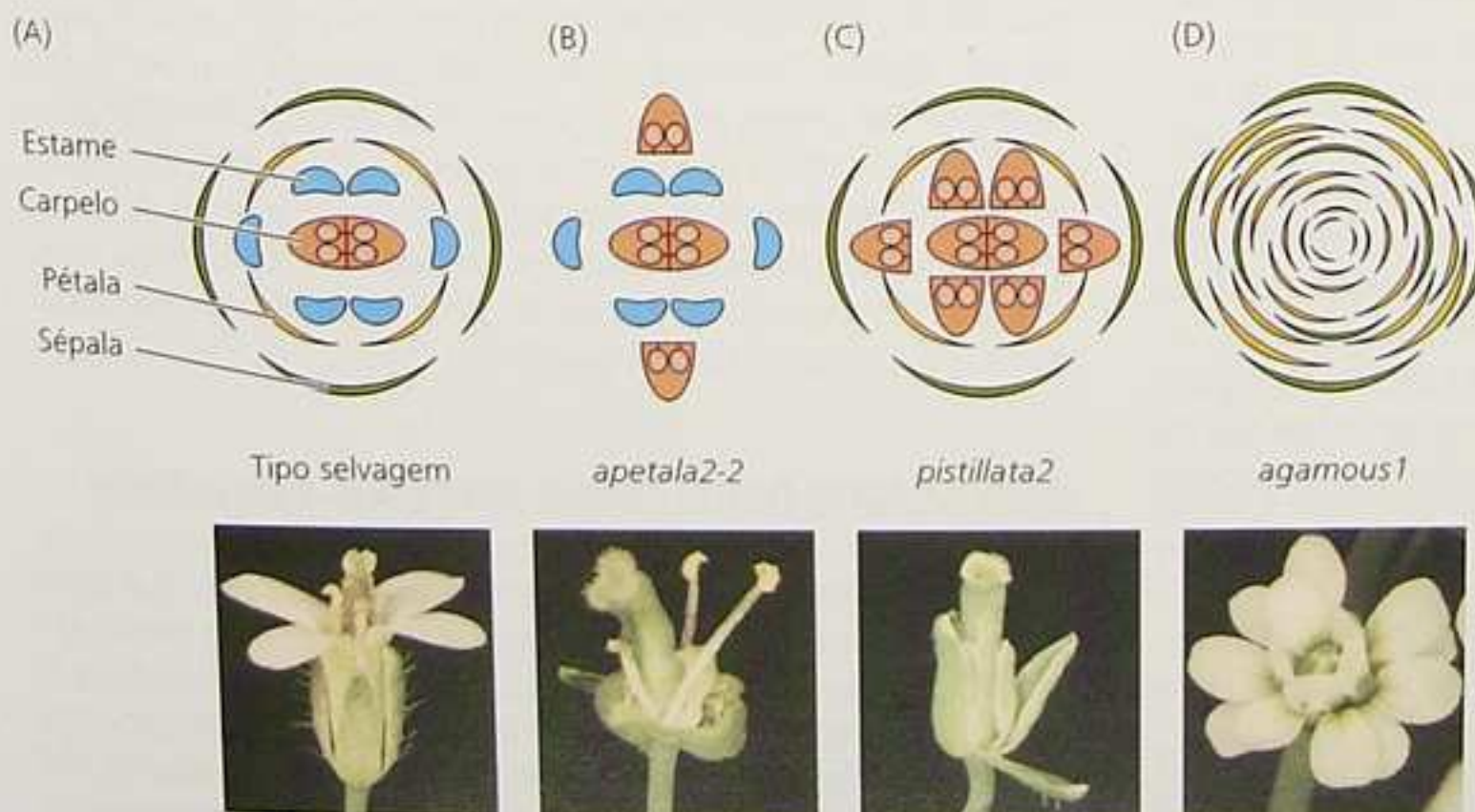



FIGURA 24.5 As mutações nos genes de identidade de órgãos florais alteram drasticamente a estrutura da flor. (A) Tipo selvagem; (B) mutantes *apetal2-2* não possuem sépalas e pétalas; (C) mutantes *pistillata2* não possuem pétalas e estames; (D) mutantes *agamous1* não possuem estames e carpelos (Bewley e cols., 2000).

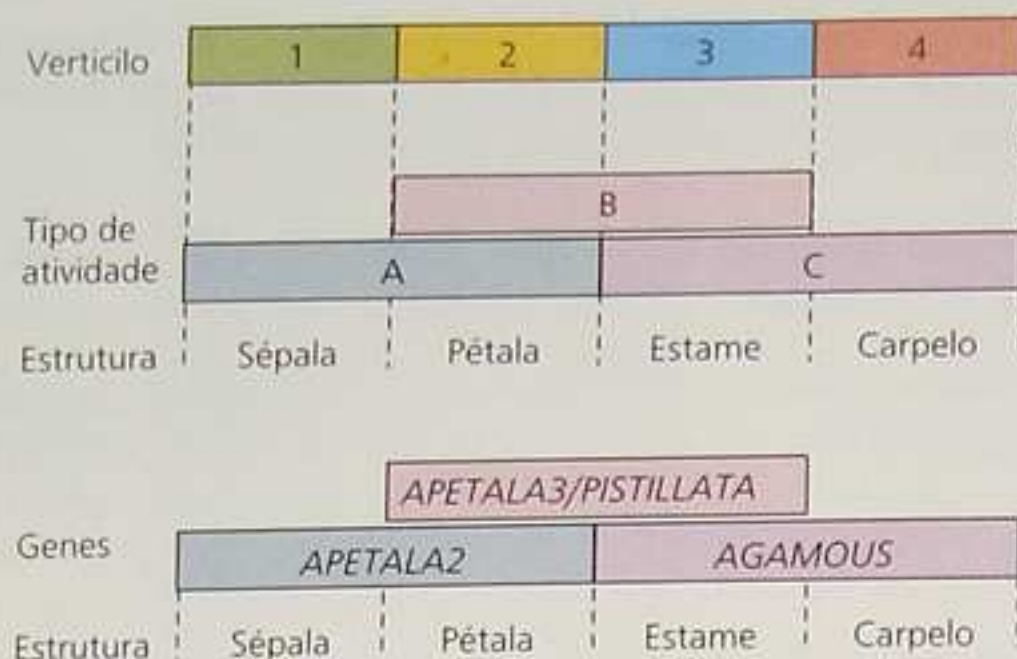



FIGURA 24.6 O modelo ABC para a aquisição da identidade de órgão floral está baseado nas interações de três tipos diferentes de atividades de genes homeóticos florais: A, B, e C. No primeiro verticilo, a expressão do tipo A (*AP2*) sozinho resulta na formação de sépalas. No segundo, a expressão dos tipos A (*AP2*) e B (*AP3/PI*) resulta na formação de pétalas. No terceiro verticilo, a expressão do B (*AP3/PI*) e C (*AG*) causa a formação de estames. No quarto verticilo, a atividade C (*AG*) sozinha especifica carpelos. Além disso, a atividade A (*AP2*) reprime a atividade C (*AG*) nos verticilos 1 e 2, enquanto a atividade C reprime a atividade A nos verticilos 3 e 4.

FIGURA 24.7 Um mutante quádruplo (*api1, ap2, ap3/pi, ag*) resulta na produção de estruturas tipo folha, em lugar de órgãos florais (cedida por John Bowman).

3. A atividade C, codificada pelo *AG*, controla eventos no terceiro e quarto verticilos. A perda da atividade tipo C resulta na formação de pétalas, e não de estames no terceiro verticilo, além de substituição do quarto verticilo por uma nova flor, de modo que o quarto verticilo da flor do mutante *ag* é ocupado por sépalas.

O controle da identidade de órgãos pelos genes homeóticos tipo A, B, e C (o modelo ABC) será descrito em maior detalhe na próxima seção.

O papel dos genes de identidade de órgãos no desenvolvimento floral é ilustrado de forma marcante por experimentos nos quais duas ou três atividades são eliminadas por mutações de perda de função (Figura 24.7). As plantas quádruplo-mutantes (*ap1, ap2, ap3/pi* e *ag*) produzem meristemas florais que se desenvolvem como pseudoflores; todos os órgãos florais são substituídos por estruturas verdes tipo folhas, embora esses órgãos sejam produzidos com uma filotaxia verticilada. Biólogos evolucionistas, a começar pelo poeta, filósofo e naturalista alemão Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), especularam que os órgãos florais são folhas altamente modificadas e a experimentação tem dado suporte a estas idéias.

O modelo ABC explica a determinação da identidade de órgãos florais

Em 1991, o **modelo ABC** foi proposto para explicar como os genes homeóticos controlam a identidade de órgãos. O modelo ABC postula que a identidade dos órgãos em cada um dos verticilos é determinada por uma combinação única das atividades de três genes de identidade de órgãos (ver Figura 24.6):

- A atividade do tipo A sozinha especifica sépalas.
- As atividades dos tipos A e B são necessárias para a formação de pétalas.
- As atividades de B e C formam estames.
- A atividade de C sozinha especifica carpelos.

O modelo propõe, ainda, que as atividades A e C reprimem-se mutuamente (ver Figura 24.6), isto é, os genes dos tipos A e C possuem função cadastral, além de suas funções na determinação da identidade de órgãos.

Os padrões de formação dos órgãos no tipo selvagem e na maioria dos fenótipos mutantes são previstos e explicados por este modelo (Figura 24.8). O desafio agora é entender como o padrão de expressão destes genes de identidade de órgãos é controlado pelos genes cadastrais; como os genes de identidade de órgãos, que codificam fatores de transcrição, alteram o padrão de outros genes expressos no órgão em desenvolvimento e, finalmente, como esse padrão alterado de expressão gênica resulta no desenvolvimento de um órgão floral específico.

EVOCAÇÃO FLORAL: SINAIS INTERNOS E EXTERNOS

Uma planta pode florescer poucas semanas após germinar, como nas plantas anuais como *Senecio vulgaris*. Por outro lado, outras, perenes, tais como algumas árvores de florestas, podem crescer por 20 anos ou mais antes de começarem a produzir flores. Espécies diferentes florescem com idades completamente distintas, indicando que a idade, ou talvez o tamanho da planta é um fator *interno* que controla a passagem para o desenvolvimento reprodutivo. O caso no qual o florescimento ocorre estritamente em resposta a fatores de desenvolvimento internos e não depende de nenhuma condição particular de ambiente é referida como *regulação autônoma*.

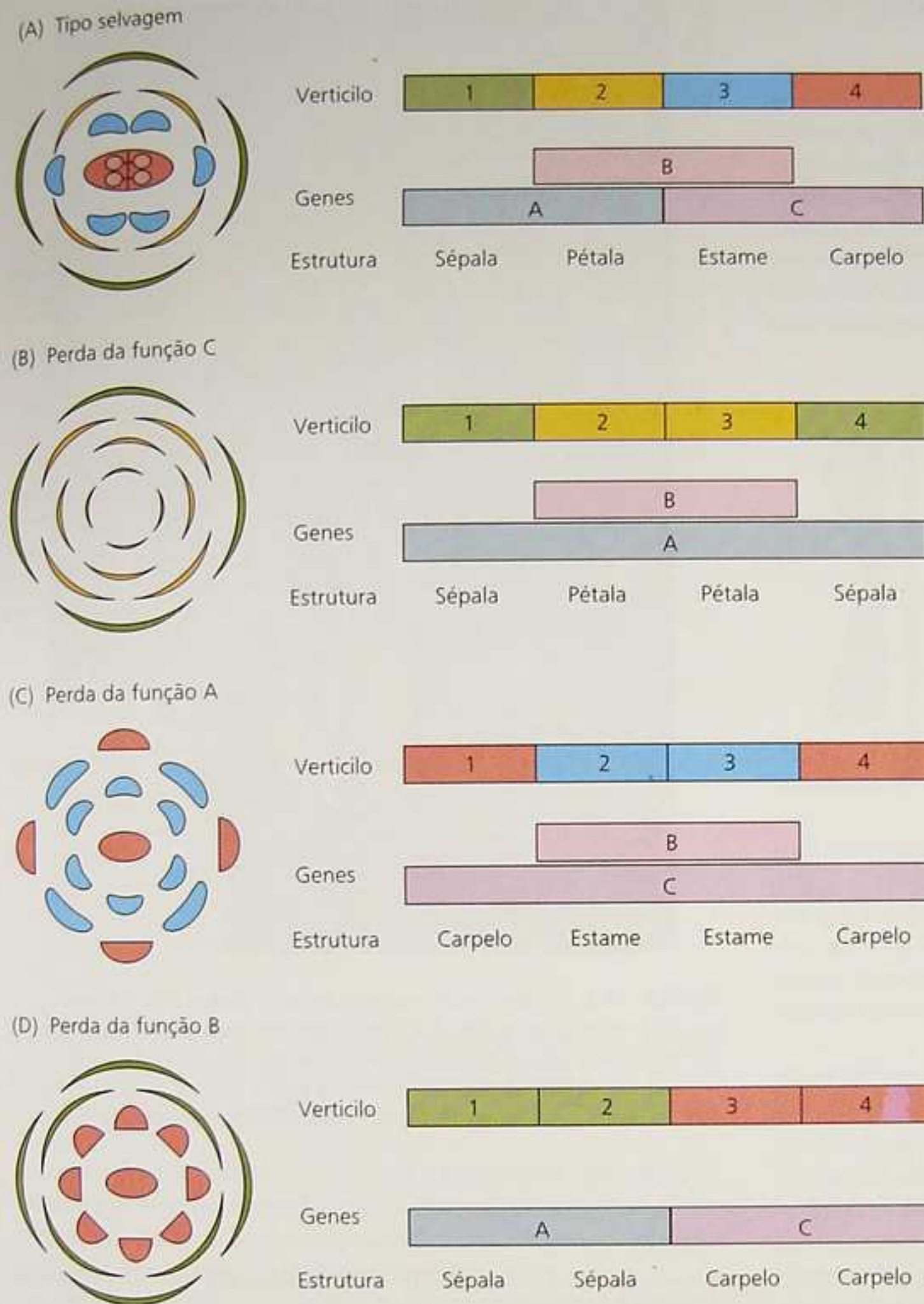



FIGURA 24.8 Interpretação dos fenótipos de mutantes florais homeóticos baseados no modelo ABC. (A) Tipo selvagem. (B) A perda da função C resulta na expansão da função A ao longo do meristema floral. (C) A perda da função A resulta na distribuição da função C ao longo do meristema. (D) A perda da função B resulta na expressão somente das funções A e C.

Em contraste com as plantas que florescem inteiramente por intermédio de uma rota autônoma, algumas plantas exibem uma exigência absoluta dos sinais ambientais corretos para que possam florescer. Esta condição é denominada resposta *obrigatória* ou *qualitativa* a um sinal ambiental. Em outras espécies, o florescimento é promovido por certos sinais ambientais, mas pode também ocorrer na ausência deles. É a chamada de resposta *facultativa* ou *quantitativa* a um sinal ambiental. O florescimento deste último grupo de plantas, o qual inclui *Arabidopsis*, baseia-se em sistemas de florescimento tanto ambientais quanto autônomos.

O fotoperiodismo e a vernalização são dois dos mais importantes mecanismos que marcam as respostas sazonais. O *fotoperiodismo* é uma resposta ao comprimento do dia; a *vernalização* é a promoção do florescimento — em temperaturas subseqüentes mais altas — levado a cabo pela exposição ao frio. Outros sinais, tais como o total de radiação luminosa e a disponibilidade de água, podem também ser importantes sinais externos.

A evolução dos sistemas de controle interno (autônomo) e externo (sensível ao ambiente) permite às plantas regular cuidadosamente o florescimento na época ótima para o sucesso reprodutivo. Por exemplo, em muitas populações de uma espécie em particular, o florescimento é sincronizado, sincronia esta que favorece o intercruzamento e permite que as sementes sejam produzidas em ambientes favoráveis, em particular quanto à água e à temperatura.

O ÁPICE DO CAULE E AS MUDANÇAS DE FASE

Todos os organismos multicelulares passam por uma série de estádios de desenvolvimento mais ou menos definidos, cada um com suas características próprias. Nos humanos, a fase de recém-nascido, a infância, adolescência e a idade adulta representam quatro estádios gerais de desenvolvimento, sendo a puberdade a linha divisória entre as fases não-reprodutiva e reprodutiva. As plantas superiores, da mesma forma, passam por estádios de desenvolvimento, porém, enquanto nos animais estas mudanças ocorrem no organismo inteiro, nas plantas superiores eles ocorrem em uma única região dinâmica, o **meristema apical do caule**.

O meristema apical do caule possui três fases de desenvolvimento

Durante o desenvolvimento pós-embrionário, o meristema apical do caule passa por três fases de desenvolvimento mais ou menos bem-definidas em seqüência:

1. A fase juvenil.
2. A fase adulta vegetativa.
3. A fase adulta reprodutiva.

A transição de uma fase para outra é chamada de **mudança de fase.**

A principal distinção entre as fases juvenil e adulta é esta última possuir a capacidade de formar estruturas reprodutivas: flores nas angiospermas e cones nas gimnospermas. Entretanto, a expressão real da competência reprodutiva da fase adulta (i. é, o florescimento) em geral depende de sinais específicos de desenvolvimento e ambientais. Assim, a ausência do florescimento não é um indicador confiável da juvenilidade.

A transição de juvenil para adulto é freqüentemente acompanhada por mudanças nas características vegetativas, tais como morfologia, filotaxia (o arranjo das folhas no ramo), quantidade de espinhos, capacidade de enraizamento e retenção das folhas em espécies decíduas (Figura 24.9; ver também **Tópico 24.1 na Internet**). Tais mudanças são mais evidentes em lenhosas perenes, mas são também aparentes em muitas espécies herbáceas. Diferente da transição abrupta da fase vegetativa adulta para a fase reprodutiva, a transição de juvenil para adulto vegetativo é em geral gradual, envolvendo formas intermediárias.

Às vezes a transição pode ser observada em uma única folha, como, por exemplo, a transformação progressiva das folhas juvenis da leguminosa arbórea *Acacia heterophylla* em filódios, um fenômeno observado por Goethe. Enquanto as folhas compostas pinadas juvenis consistem de uma ráquis (ramo) e folíolos, os filódios adultos são estruturas especializadas parecendo pecíolos achatados (Figura 24.10).

Estruturas intermediárias também são formadas durante a transição das folhas aquáticas para aéreas de plantas aquáticas, como *Hippuris vulgaris*. Como no caso de *A. heterophylla*, tais formas intermediárias possuem regiões distintas com diferentes padrões de desenvolvimento. Para levar em conta as formas intermediárias durante a transição de juvenil para adulto no milho (ver **Tópico 24.2 na Internet**), foi proposto um **modelo combinatório** (Figura 24.11). De acordo com este modelo, o desenvolvimento do caule pode ser descrito como uma série de programas *sobrepostos* independentemente regulados (juvenil, adulto e reprodutivo) que modulam a expressão de um conjunto comum de processos de desenvolvimento.

FIGURA 24.9 Fases juvenil e adulta de hera (*Hedera helix*). A fase juvenil possui folhas palmadas lobadas em um arranjo alternado, um hábito de crescimento trepador e não apresenta flores. A fase adulta (projetando-se para fora à direita) possui folhas inteiras ovadas em um arranjo espiral, um crescimento para cima e flores (fotografia de L. Taiz).

Na transição de folhas juvenis para adultas, as formas intermediárias indicam que diferentes regiões da mesma folha podem expressar distintos programas de desenvolvimento. Assim, as células na ponta da folha permanecem comprometidas com o programa juvenil, enquanto aquelas na base da folha tornam-se comprometidas com o programa adulto. Os destinos no desenvolvimento destes dois conjuntos de células na mesma folha são bastante diversificados.

Os tecidos juvenis são produzidos primeiro e estão localizados na base do caule

A seqüência cronológica das três fases de desenvolvimento resulta em um gradiente espacial de juvenilidade ao longo do eixo do ramo. Pelo fato de o crescimento em altura estar restrito ao meristema apical, os tecidos e os órgãos juvenis, que são formados primeiro, localizam-se na base da parte aérea. Nas espécies herbáceas de florescimento rápido, a fase juvenil pode durar apenas poucos dias, sendo produzidas algumas estruturas juvenis. As espécies

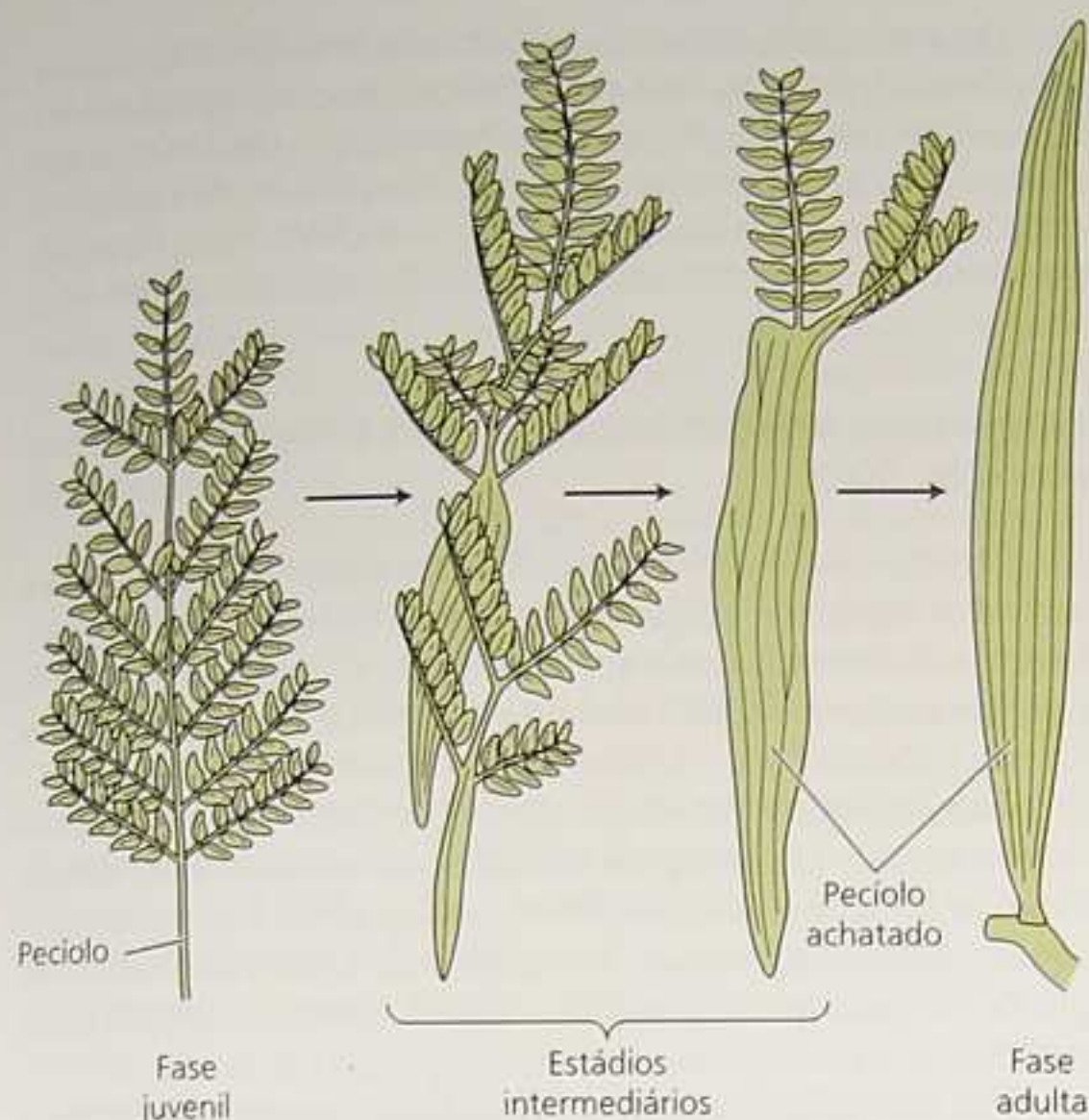



FIGURA 24.10 Folhas de *Acacia heterophylla*, mostrando a transição de folhas compostas pinadas (fase juvenil) para filódios (fase adulta). Observar que a fase anterior é mantida no topo da folha nas formas intermediárias.

FIGURA 24.11 Representação esquemática do modelo combinatório de desenvolvimento da parte aérea em milho. Os gradientes de expressão sobrepostos das fases juvenil, adulto vegetativo e reprodutivo estão indicados ao longo do comprimento do eixo principal e dos ramos. A linha preta contínua representa processos que são exigidos durante todas as fases de desenvolvimento. Cada uma das três fases pode ser regulada por programas separados de desenvolvimento, com fases intermediárias aparecendo quando os programas se sobrepõem. (A) Planta jovem adulta vegetativa. (B) Planta florescendo (Poethig, 1990).

lenhosas, por outro lado, possuem uma fase juvenil mais prolongada, em alguns casos durando 30 a 40 anos (Tabela 24.1). Nestes casos, as estruturas juvenis podem compor uma parte expressiva da planta madura.

Quando o meristema muda para a fase adulta, são produzidas somente estruturas vegetativas adultas, culminando com a evocação floral. As fases adulta e reprodutiva estão, assim, localizadas na região superior periférica da parte aérea.

A obtenção de um tamanho suficientemente grande parece ser mais importante do que a idade cronológica da planta na determinação da transição para a fase adulta. Condições que retardam o crescimento, tais como deficiências minerais, baixa intensidade luminosa, estresse hídrico, desfolhamento e baixa temperatura, tendem a prolongar a fase juvenil ou mesmo causar um **rejuvenescimento** (reversão para juvenilidade) das partes aéreas adultas. Por outro lado, condições que promovam crescimento vigoroso aceleram a transição para a fase adulta. Quando o crescimento é acelerado, a exposição ao correto tratamento para indução de flores pode resultar em florescimento.

Embora o tamanho da planta pareça ser o fator mais importante, nem sempre fica claro qual o componente específico associado ao tamanho é crítico. Em algumas espécies de *Nicotiana*, parece que as plantas necessitam produzir um certo número de folhas para transmitir a quantidade suficiente de estímulo floral para o ápice.

Uma vez alcançada a fase adulta, a mesma é relativamente estável, mantendo-se durante a propagação vegetativa ou enxertia. Por exemplo, em plantas maduras de hera (*Hedera helix*), esta-

TABELA 24.1
Comprimento do período juvenil em algumas espécies lenhosas

Espécie	Comprimento do período juvenil
Rosa (*Rosa* [híbrido chá])	20-30 dias
Uva (*Vitis* spp.)	1 ano
Maçã (*Malus* spp.)	4-8 anos
Citrus spp.	5-8 anos
Hera (*Hedera helix*)	5-10 anos
Sequoia sempervirens	5-15 anos
Acer pseudoplatanus	15-20 anos
Quercus robur (Carvalho inglês)	25-30 anos
Fagus sylvatica (Faia européia)	30-40 anos

Fonte: Clark, 1983

cas retiradas da região basal desenvolvem-se em plantas juvenis, enquanto aquelas retiradas da extremidade se desenvolvem em plantas adultas. Quando ramos tomados da base de bétula (*Betula verrucosa*) em florescimento foram enxertados em plântulas porta enxertos, não apareceram flores nos enxertos dentro dos primeiros dois anos. Em contraste, os enxertos floresceram livremente quando os ramos foram retirados do topo da árvore em florescimento.

Em algumas espécies, o meristema juvenil parece ser capaz de florescer, porém não recebe estímulo floral suficiente até que a planta se torne suficientemente grande. Na mangueira (*Mangifera indica*), por exemplo, as plântulas juvenis podem ser induzidas a florescer quando enxertadas em uma árvore madura. Em muitas outras espécies lenhosas, entretanto, o enxerto em uma planta adulta não induz o florescimento.

Mudanças de fase podem ser influenciadas por nutrientes, giberelinas e outros sinais químicos

A transição, no ápice do caule, da fase juvenil para a fase adulta pode ser afetada por fatores transmissíveis oriundos do restante da planta. Em muitas plantas, a exposição a condições de baixa intensidade luminosa prolonga a juvenilidade ou provoca uma volta à juvenilidade. A principal conseqüência do regime de baixa luminosidade é uma redução no suprimento de carboidratos ao ápice; assim, o suprimento de carboidratos, especialmente sacarose, pode desempenhar um papel na transição entre a juvenilidade e maturidade. O suprimento de carboidratos como fonte de energia e matéria-prima pode afetar o tamanho do ápice. Por exemplo, no crisântemo (*Chrysanthemum morifolium*), os primórdios florais não são iniciados até que um tamanho mínimo do ápice seja atingido.

O ápice recebe, do resto da planta, uma variedade de fatores hormonais, entre outros, além de carboidratos e nutrientes. Evidências experimentais mostram que a aplicação de giberelinas leva à formação de estruturas reprodutivas em plantas jovens de várias famílias de coníferas. O envolvimento das GAs *endógenas* no controle da reprodução é também indicado pelo fato de outros tratamentos (p. ex., remoção de raízes, estresse hídrico e deficiência profunda de nutrientes) acelerarem a produção de cones em pinheiros, geralmente também resultando em um acúmulo de GAs na planta.

Por outro lado, embora as giberelinas levem à obtenção da maturidade reprodutiva em coníferas e muitas angiospermas herbáceas também, GA_3 provoca rejuvenescimento em *Hedera* e em várias outras angiospermas lenhosas. O papel das giberelinas no controle da mudança de fase é, assim, complexo, variando entre espécies e provavelmente envolvendo interações com outros fatores.

Competência e determinação são dois estádios na evocação floral

O termo *juvenilidade* tem significados diferentes para espécies herbáceas e lenhosas. Enquanto meristemas herbáceos juvenis prontamente florescem quando enxertados em uma planta adulta em florescimento (ver **Tópico 24.3 na Internet**), meristemas lenhosos juvenis geralmente não. Qual é a diferença entre os dois?

Estudos extensivos em tabaco demonstraram que a evocação floral exige que a gema apical passe por dois estádios de desenvolvimento (Figura 24.12) (McDaniel e cols., 1992). Um estádio é a aquisição de competência. Uma gema é dita **competente** se é capaz de florescer quando receber o sinal de desenvolvimento apropriado.

Por exemplo, se um ramo vegetativo (enxerto) é enxertado em um porta-enxerto em florescimento e o enxerto floresce imediatamente, ele é cabalmente capaz de responder ao nível de estímulo floral apresentado pelo porta-enxerto e é, portanto, competente. O não-florescimento do enxerto indicaria que o meristema apical do ramo ainda não obteve competência. Assim, os meristemas juvenis das plantas herbáceas são competentes para florescer, porém os de espécies lenhosas, não.

O estádio seguinte que uma gema vegetativa competente atravessa é a determinação. Uma gema é dita **determinada** se progredir para o próximo estágio de desenvolvimento (florescimento), mesmo depois de ser removida de seu contexto normal. Assim, uma gema determinada do ponto de vista floral produzirá flores, mesmo se for enxertada em uma planta vegetativa que não esteja produzindo nenhum estímulo floral.

Em tabaco de dia neutro, por exemplo, as plantas tipicamente florescem após produzir aproximadamente 41 folhas ou nós. Em um experimento para medir a determinação floral das gemas axi-

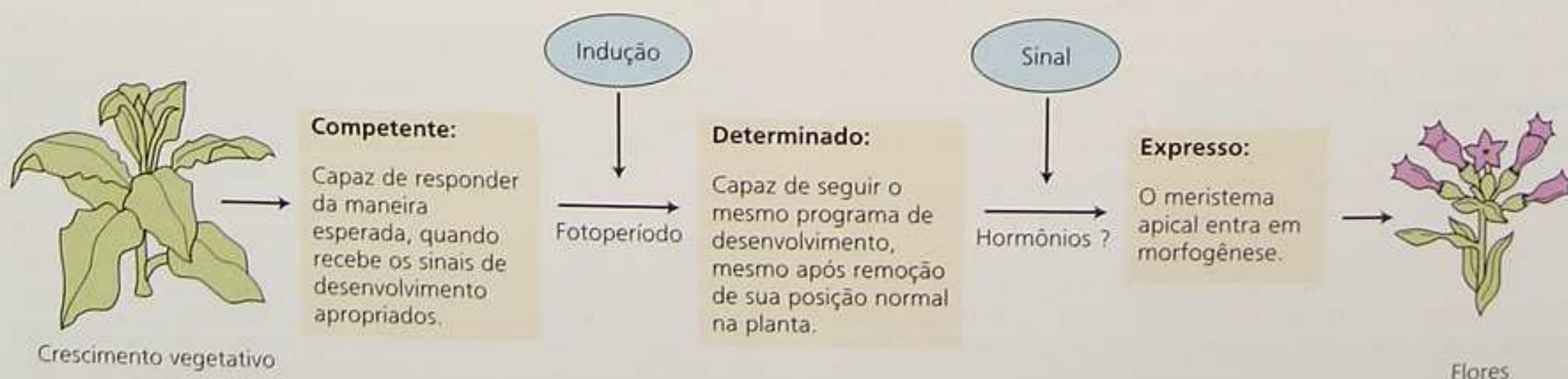



FIGURA 24.12 Um modelo simplificado para evocação floral no ápice do caule, no qual as células do meristema vegetativo adquirem novos destinos do desenvolvimento. Para iniciar o desenvolvimento floral, as células do meristema necessitam primeiro tornar-se competentes. Um meristema vegetativo competente é aquele que pode responder a um estímulo floral (indução), tornando-se determinado do ponto de vista floral (comprometido a produzir flores). O estado determinado é geralmente expresso, mas pode necessitar um sinal adicional (McDaniel e cols., 1992).

lares, plantas de tabaco em florescimento foram decapitadas logo acima da trigésima quarta folha (a partir da base). Liberadas da dominância apical, a gema axilar da trigésima quarta folha cresceu e, após produzir mais sete folhas (para um total de 41), floresceu (Figura 24.13A) (McDaniel, 1996). Entretanto, se a trigésima quarta gema fosse excisada da planta e enraizada ou enxertada em um porta-enxerto sem folhas próximo à base, produziria um conjunto completo de folhas (41) antes de florescer. Este resultado mostra que a trigésima quarta gema ainda não está determinada do ponto de vista floral.

Em outro experimento, a planta doadora foi decapitada acima da trigésima sétima folha. Desta vez a trigésima sétima gema axilar floresceu, após produzir quatro folhas *em todas as três situações* (ver Figura 24.13B). Este resultado demonstra que a gema terminal tornou-se determinada do ponto de vista floral, após iniciar 37 folhas.

A enxertia extensiva de ápices caulinares entre variedades de tabaco confirmou que o número de nós que um meristema produz antes da floração é função de dois fatores: (1) a força do estímulo foral das folhas e (2) a competência do meristema de responder ao sinal (McDaniel e cols., 1996).

Em alguns casos a **expressão** do florescimento pode ser retardada ou interrompida, mesmo depois do ápice tornar-se determinado, a menos que receba um segundo sinal de desenvolvimento que estimule a expressão (ver Figura 24.12). Por exemplo, plantas intactas de *Lolium temulentum* tornam-se aptas ao florescimento após uma única exposição a um dia longo. Se o meristema apical do caule de *Lolium* for excisado 28 horas após o início de um dia longo e cultivado *in vitro*, irá produzir inflorescências normais em cultura, porém somente se o hormônio ácido giberélico (GA) estiver presente no meio de cultura. Pelo fato de os ápices cultivados oriundos de plantas crescidas exclusivamente em dias curtos nunca florescerem, mesmo na presença de GA, pode-se concluir que dias longos são necessários para a determinação em *Lolium*, enquanto GA é necessário para a *expressão* do estado determinado.

Em geral, uma vez que tenha se tornado competente, o meristema exibe um tendência crescente de florescer com a idade (número de folhas). Por exemplo, em plantas controladas pelo comprimento do dia, o número de ciclos de dia curto ou dia longo necessários para atingir o florescimento é em geral menor em plantas mais velhas (Figura 24.14). Como será discutido mais tarde neste capítulo, este aumento na tendência de florescer com a idade tem sua base fisiológica na maior capacidade das folhas de produzir o estímulo floral.

Antes de se discutir como as plantas percebem o comprimento do dia, contudo, será estabelecida a fundamentação examinando como os organismos em geral medem o tempo. Este tópico é conhecido como **cronobiologia**, ou o estudo dos **relógios biológicos.** O relógio biológico mais compreendido até hoje é o ritmo circadiano.

RITMOS CIRCADIANOS: O RELÓGIO INTERNO

Os organismos estão normalmente sujeitos a ciclos diários de luz e escuro, e tanto plantas quanto animais geralmente exibem um comportamento cíclico associado com tais alterações. Exemplos des-

(A) Gema não-determinada

Decapitação aqui

Doador *In situ* Enraizada Enxertada

(B) Gema determinada do ponto de vista floral

Decapitação aqui

Doador *In situ* Enraizada Enxertada

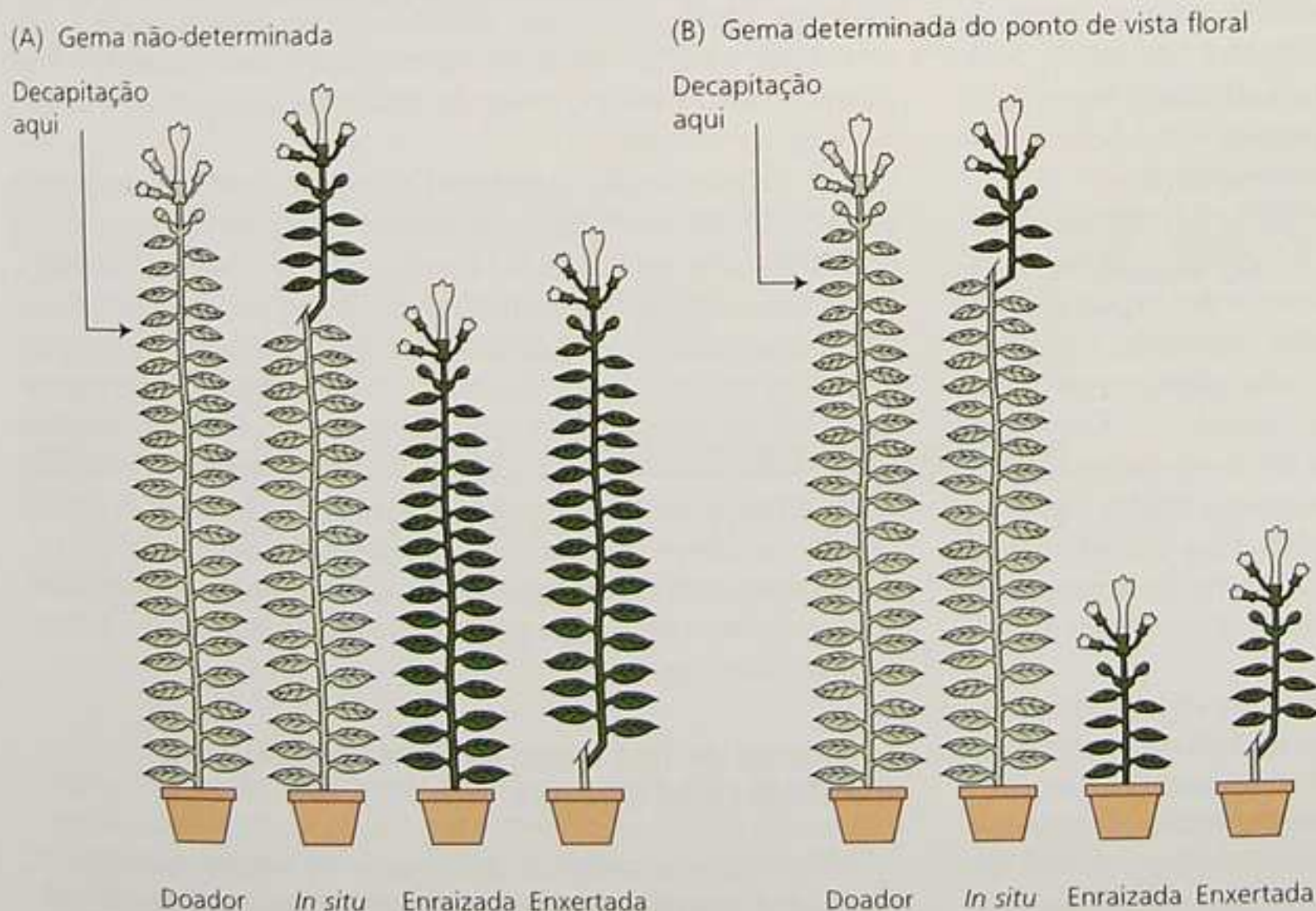



FIGURA 24.13 Demonstração do estado determinado das gemas axilares em tabaco. Uma gema axilar específica de uma planta doadora em florescimento é forçada a crescer, seja diretamente na planta (*in situ*) por decapitação ou por enraizamento ou enxertia à base da planta. As novas folhas e flores produzidas pela gema axilar estão indicados pelo sombreamento. (A) Resultado quando a gema não está determinada. (B) Resultado quando a gema está determinada do ponto de vista floral (McDaniel, 1996).

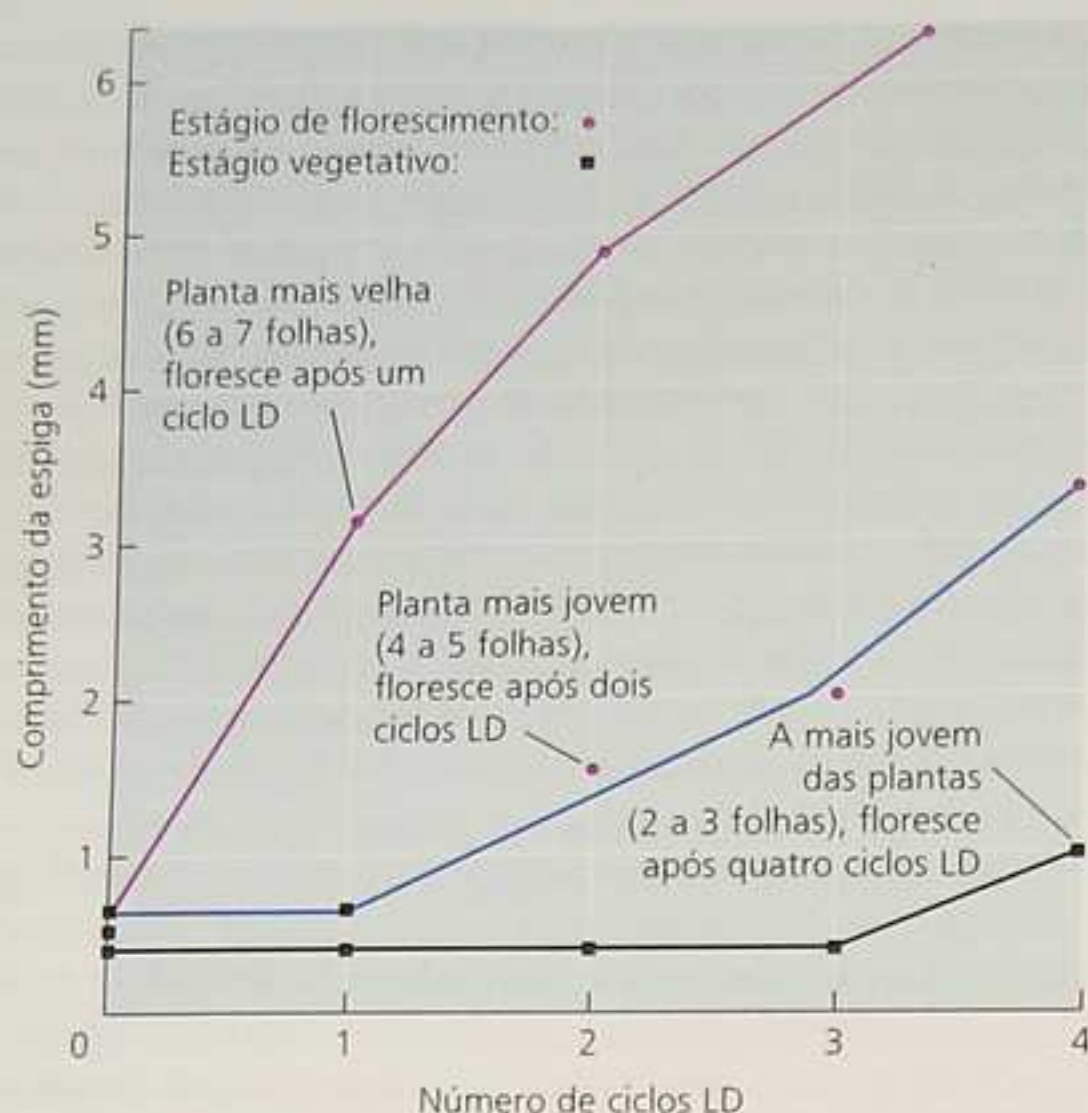



FIGURA 24.14 Efeito da idade da planta no número de ciclos indutivos de dias longos (LD) necessários para o florescimento na planta de dia longo *Lolium temulentum*. Um ciclo indutivo de dia longo consistiu de oito horas de luz solar, seguido de 16 horas de luz incandescente de baixa intensidade. Quanto mais velha a planta, menor o número de ciclos fotoindutivos necessários para produzir florescimento.

tes ritmos incluem os movimento das folhas e pétalas (posições de dia e noite), abertura e fechamento estomáticos, padrões de crescimento e esporulação em fungos (p. ex., *Pilobolus* e *Neurospora*), hora do dia para emergência de pupas (a mosca-da-fruta *Drosophila*) e ciclos de atividade de roedores, além de processos metabólicos, tais como a capacidade fotossintética e a taxa de respiração.

Quando os organismos são transferidos de um ciclo diário de luz e escuro para o escuro contínuo (ou luz contínua de baixa intensidade), muitos destes ritmos continuam a ser expressos por, pelo menos, vários dias. Sob tais condições uniformes, o período do ritmo é então próximo a 24 horas e, conseqüentemente, a expressão ritmo circadiano é aplicada (ver Capítulo 17). Devido ao fato de continuarem em um ambiente de luz constante ou escuro, estes ritmos circadianos não podem ser respostas diretas à presença ou à ausência de luz, mas devem ser baseados em um marca-passo interno, geralmente chamado de oscilador endógeno. Um modelo molecular para um oscilador endógeno vegetal foi descrito no Capítulo 17.

O oscilador endógeno está acoplado a uma variedade de processos fisiológicos, tais como movimentos foliares ou fotossíntese, e ele mantém o ritmo. Por isso, o oscilador endógeno pode ser considerado o mecanismo do relógio e as funções fisiológicas que estão sendo reguladas, tais como os movimentos foliares ou fotossíntese, são às vezes chamadas de ponteiros do relógio.

Os ritmos circadianos exibem características marcantes

Os ritmos circadianos são fenômenos cíclicos definidos por três parâmetros:

1. **Período**, o tempo entre pontos comparáveis dentro do ciclo. Tipicamente, o período é medido como o tempo entre máximos (picos) ou mínimos (vales) consecutivos (Figura 24.15A).
2. **Fase**[2], qualquer ponto no ciclo que seja reconhecido por seu relacionamento com o restante do ciclo. Os pontos de fase mais óbvios são as posições de picos e vales.
3. **Amplitude**, geralmente considerada como a distância entre pico e vale. A amplitude de um ritmo biológico pode com freqüência variar, enquanto o período permanece inalterado (p. ex., na Figura 24.15C).

Em condições de luz constante ou escuro, os ritmos desviam de um período exato de 24 horas. Os ritmos, então, são desviados em relação ao horário solar, seja ganhando seja perdendo tempo, dependendo se o período é mais curto ou mais longo do que 24 horas. Sob condições naturais, o oscilador endógeno é **sincronizado** com um período verdadeiro de 24 horas por sinais ambientais, o mais importante dos quais são as transições luz — escuro ao entardecer e a transição escuro — luz ao amanhecer (ver Figura 24.15B).

Estes sinais ambientais são chamados ***zeitgebers*** (do alemão, para "fornecedores do tempo"). Quando estes são removidos — por exemplo, por transferência ao escuro contínuo —, o ritmo é dito ser de **curso livre** e reverte para o período circadiano característico do órgão específico (ver Figura 24.15B).

Embora os ritmos sejam gerados internamente, eles normalmente necessitam de um sinal ambiental, como a exposição à luz ou a mudança de temperatura, por exemplo, para iniciarem sua expressão. Além disso, muitos ritmos ficam amortecidos (i. é, a amplitude diminui) quando o organismo está em um ambiente constante por algum tempo e então necessitam de um *zeitgeber* ambiental, como a transferência da luz para o escuro ou a mudança de temperatura, para serem reiniciados (ver Figura 24.15C). Observar que o relógio em si não reduz a amplitude; somente o acoplamento entre o relógio molecular (oscilador endógeno) e a função fisiológica é afetada.

O relógio circadiano não teria valor para o organismo se não pudesse manter uma contagem acurada de tempo sob as temperaturas flutuantes experimentadas em condições naturais. De fato, a temperatura tem pouco ou nenhum efeito no período de curso livre. A característica que permite ao relógio monitorar o tempo em diferentes temperaturas é chamada de **compensação de temperatura.** Embora todos os passos bioquímicos na rota sejam sensíveis à temperatura, suas respostas à temperatura provavelmente cancelam umas às outras. Por exemplo, alterações nas taxas de síntese de intermediários poderiam ser compensadas por mudanças paralelas em suas taxas de degradação. Assim, os níveis de equilíbrio dos reguladores do relógio permaneceriam constantes sob temperaturas diferentes.

A mudança de fase ajusta os ritmos circadianos a diferentes ciclos dia-noite

Nos ritmos circadianos, a operação do oscilador endógeno ajusta uma resposta para que ocorra em uma certa hora do dia. Um único oscilador pode estar acoplado a múltiplos ritmos circa-

[2] O termo fase não deve ser confundido com mudança de fase no desenvolvimento do meristema, discutido anteriormente.

(A) Um ritmo circadiano típico. O **período** é o tempo entre pontos comparáveis no ciclo repetitivo; a **fase** é qualquer ponto no ciclo reconhecível por seu relacionamento com o restante do ciclo; a **amplitude** é a distância entre um pico e um vale.

(B) Um ritmo circadiano sincronizado a um ciclo de 24 horas de luz – escuro (L – D) e sua reversão para o período de curso livre (26 horas neste exemplo) após a transferência para o escuro contínuo.

(C) Suspensão de um ritmo circadiano em luz intensa contínua e a liberação ou reinício do ritmo após a transferência para a escuridão.

(D) Típica mudança de fase em resposta a um pulso de luz aplicado logo após a transferência para o escuro. O ritmo tem sua fase alterada (atrasado) sem alteração no período.

FIGURA 24.15 Algumas características dos ritmos circadianos.

dianos, que podem até mesmo ocorrer fora de fase uns com os outros. Como estas repostas permanecem no horário, quando a duração dos períodos de luz e escuro muda com as estações? A resposta está no fato de que a fase do ritmo pode ser alterada se o ciclo inteiro for movido para frente ou para traz sem que o período seja alterado.

Os pesquisadores geralmente testam a resposta do oscilador endógeno, colocando um organismo em escuro contínuo e examinando a resposta a curtos pulsos de luz (em geral menos do que uma hora) aplicados em diferentes pontos de fase durante o ritmo de curso livre. Quando um organismo está sincronizado a um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro e então é-lhe permitidos correr livre no escuro, a fase do ritmo que coincide com o período de luz do ciclo sincronizado anterior é chamada de **dia subjetivo** e a fase que coincide com o período escuro é denominada **noite subjetiva.**

Se um pulso de luz é aplicado durante as primeiras horas da noite subjetiva, o ritmo é atrasado; o organismo interpreta o pulso

de luz como o final do dia anterior (ver Figura 24.15D). Por outro lado, um pulso de luz aplicado no final de uma noite subjetiva avança a fase do ritmo; desta vez o organismo interpreta o pulso de luz como o início do dia seguinte.

Como já foi salientado, este é o padrão exato da resposta que seria esperada para o ritmo permanecer no horário local. Assim, as respostas de mudança de fase possibilitam ao ritmo ser sincronizado a ciclos de aproximadamente 24 horas com diferentes durações de luz e escuro, e elas demonstram que o ritmo irá correr diferentemente sob diferentes condições de comprimento do dia.

Fitocromos e criptocromos sincronizam o relógio

O mecanismo molecular pelo qual um sinal luminoso provoca uma mudança de fase ainda não é conhecido, porém estudos em *Arabidopsis* identificaram alguns dos elementos-chave do oscilador circadiano e seus *inputs* e *outputs* (ver Capítulo 17). Os níveis baixos de luz e comprimentos de onda específicos que podem induzir a mudança de fase indicam que a resposta à luz deve ser mediada por fotorreceptores específicos, em vez de taxas de fotossíntese. Por exemplo, a sincronização dos movimentos foliares nictinásticos pela luz vermelha em *Samanea*, uma leguminosa arbórea, é uma resposta de baixa fluência mediada por fitocromo (ver Capítulo 17).

Arabidopsis possui cinco fitocromos, sendo que todos menos um (o fitocromo C) estão envolvidos na sincronização do relógio. Cada fitocromo atua como um fotorreceptor específico para luz vermelha, vermelho-distante ou azul. Ademais, as proteínas CRY1 e CRY2 participam na sincronização do relógio pela luz azul, da mesma forma que o fazem em insetos e mamíferos (Devlin e Kay, 2000). Surpreendentemente, as proteínas CRY também parecem ser necessárias para a sincronização normal pela luz vermelha. Uma vez que tais proteínas não absorvem a luz vermelha, esta exigência sugere que CRY1 e CRY2 podem atuar como intermediários na sinalização pelo fitocromo durante a sincronização do relógio (Yanovsky e Kay, 2001).

Na *Drosophila*, as proteínas CRY interagem fisicamente com os componentes do relógio e, assim, constituem parte do mecanismo oscilador (Devlin e Kay, 2000). Contudo, este não parece ser o caso em *Arabidopsis*, onde duplo mutantes cry1/cry2 apresentam ritmos circadianos normais. Ainda necessita ser elucidado precisamente como as proteínas CRY de *Arabidopsis* interagem com o mecanismo oscilador endógeno para induzirem a mudança de fase (Yanovsky e cols., 2001).

FOTOPERIODISMO: MONITORANDO O COMPRIMENTO DO DIA

Como foi apresentado, o relógio circadiano possibilita aos organismos determinar a hora do *dia* em que um certo evento molecular ou bioquímico ocorre. O **fotoperiodismo** ou a capacidade de um organismo de detectar o comprimento do dia torna possível para um evento ocorrer em um determinado momento do *ano*, permitindo, desse modo, uma resposta *sazonal*. Os ritmos circadianos e o fotoperiodismo têm a propriedade comum de responder a ciclos de luz e escuro.

Precisamente no equador, os comprimentos do dia e da noite são iguais e constantes durante o ano todo. Na medida em que nos movimentamos do equador para os pólos, os dias tornam-se mais longos no verão e mais curtos no inverno (Figura 24.16). Não surpreende que as espécies vegetais tenham evoluído para detectar estas mudanças sazonais no comprimento do dia e que suas respostas fotoperiódicas específicas sejam fortemente influenciadas pela latitude da qual se originaram.

Os fenômenos fotoperiódicos são observados tanto em animais quanto em plantas. No reino animal, o comprimento do dia controla atividades sazonais tais como hibernação, desenvolvimento de coberturas de verão e inverno e atividade reprodutiva. As respostas das plantas controladas pelo comprimento do dia são numerosas, incluindo a iniciação do florescimento, a reprodução assexual, a formação de órgãos de reserva e a indução de dormência.

Talvez todas as respostas fotoperiódicas das plantas utilizem os mesmos fotorreceptores, com rotas de transdução de sinais subseqüentes específicas que regulam respostas diferentes. Por ser claro que o monitoramento da passagem do tempo é essencial às respostas fotoperiódicas, um mecanismo de contagem de tempo deve fundamentar tanto as respostas à época do ano quanto as respostas à hora do dia. Acredita-se que o oscilador circadiano forneça um mecanismo de medição do tempo que sirva de ponto de referência para a resposta aos sinais de luz (ou escuro) que chegam do ambiente. A forma como as mudanças no fotoperíodo são avaliadas contra a referência do oscilador circadiano será discutida em seguida.

As plantas podem ser classificadas por suas respostas fotoperiódicas

Várias espécies de plantas florescem durante os longos dias de verão. Por muitos anos, os fisiologistas vegetais acreditaram que a correlação entre os dias longos e o florescimento era uma conseqüência da acumulação de produtos da fotossíntese sintetizados durante aqueles dias.

O trabalho de Wightman Garner e Henry Allard, conduzido na década de 1920 nos laboratórios do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em Beltsville, Maryland, mostrou que esta hipótese estava incorreta. Eles constataram que uma variedade mutante de tabaco, *Maryland Mammoth*, crescia bastante, até aproximadamente 5 m em altura, porém não florescia nas condições predominantes do verão (Figura 24.17). Entretanto, as plantas floresceram na casa de vegetação durante o inverno sob condições naturais de luz.

Estes resultados levaram Garner e Allard a testar o efeito de encurtar artificialmente os dias, cobrindo as plantas cultivadas durante os dias longos do verão com uma tenda à prova de luz do final da tarde até a manhã seguinte. Esses dias curtos artificiais provocaram o florescimento das plantas. Esta necessidade de dias curtos era difícil de conciliar com a idéia que longos períodos de radiação e o resultante aumento na fotossíntese promoviam o florescimento. Garner e Allard concluíram que o comprimento do dia era o fator determinante do florescimento, e foram capazes de confirmar esta hipótese em muitas espécies e condições diferentes. Este trabalho lançou as bases para a subseqüente e extensa pesquisa sobre as respostas fotoperiódicas.

A classificação das plantas de acordo com suas respostas fotoperiódicas está baseada no florescimento, embora muitos outros aspectos do desenvolvimento das plantas possam também ser afetados pelo comprimento do dia. As duas principais categorias de respostas fotoperiódicas são plantas de dias curtos e plantas de dias longos:

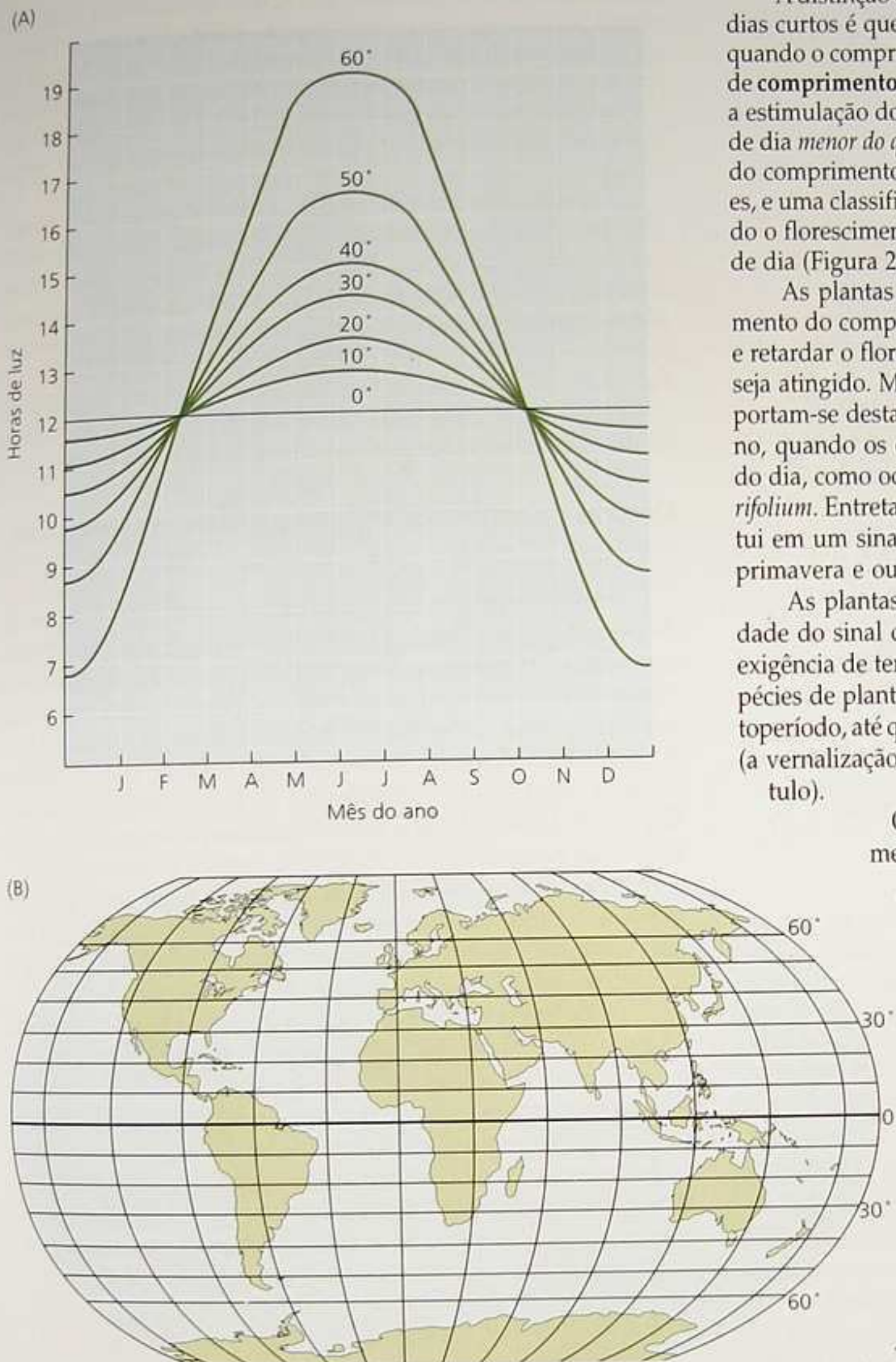



FIGURA 24.16 (A) O efeito da latitude sobre o comprimento do dia em diferentes épocas do ano. O comprimento do dia foi medido no dia vinte de cada mês. (B) Mapa-múndi mostrando longitudes e latitudes.

1. **Plantas de dias curtos (SDPs;** do inglês, *Short-day plants*) florescem apenas em dias curtos (SDPs *qualitativas*) ou têm florescimento acelerado por dias curtos (SDPs *quantitativas*).

2. **Plantas de dias longos (LDPs;** do inglês, *Long-day plants*) florescem somente em dias longos (LDPs *qualitativas*) ou têm florescimento acelerado por dias longos (LDPs *quantitativas*).

A distinção essencial entre plantas de dias longos e plantas de dias curtos é que o florescimento nas LDPs é estimulado somente quando o comprimento do dia *excede* uma certa duração, chamada de **comprimento crítico do dia**, em cada ciclo de 24 horas, enquanto a estimulação do florescimento nas SDPs requer um comprimento de dia *menor do que* o comprimento crítico do dia. O valor absoluto do comprimento crítico do dia varia amplamente entre as espécies, e uma classificação fotoperiódica correta só pode ser feita quando o florescimento é examinado para uma série de comprimentos de dia (Figura 24.18).

As plantas de dias longos podem efetivamente medir o aumento do comprimento dos dias da primavera ou início do verão e retardar o florescimento, até que o comprimento crítico dos dias seja atingido. Muitas variedades de trigo (*Triticum aestivum*) comportam-se desta maneira. As SDPs geralmente florescem no outono, quando os dias encurtam abaixo de um comprimento crítico do dia, como ocorre em muitas variedades de *Chrysanthemum morifolium*. Entretanto, o comprimento do dia isoladamente se constitui em um sinal ambíguo, porque não é possível distinguir entre primavera e outono.

As plantas exibem várias adaptações para evitar a ambigüidade do sinal do comprimento do dia. Uma delas é a ligação da exigência de temperatura a uma resposta fotoperiódica. Certas espécies de plantas, como o trigo de inverno, não respondem ao fotoperíodo, até que tenha ocorrido um período de frio (vernalização) (a vernalização será discutida um pouco mais adiante neste capítulo).

Outras plantas evitam a ambigüidade sazonal, por meio da distinção entre dias que estão *encurtando* e *alongando*. Estas plantas com "dualidade de comprimento de dia" enquadram-se em duas categorias:

1. **Plantas de dias longo-curtos (LSDPs;** do inglês, *Long-short-day plants*) florescem somente após uma seqüência de dias longos seguida por dias curtos. LSDPs, tais como *Bryophyllum*, *Kalanchoe* e *Cestrum nocturnum* (jasmim-da-noite), florescem no final do verão e outono, quando os dias estão encurtando.

2. **Plantas de dias curto-longos (SLDPs;** do inglês, *Short-long-day plants*) florescem apenas após uma seqüência de dias curtos seguida por dias longos. SLDPs, tais como *Trifolium repens* (trevo branco), *Campanula medium* (campainha) e *Echeveria harmsii*, florescem no início da primavera em resposta ao aumento do comprimento dos dias.

Por fim, espécies que florescem em qualquer condição de fotoperíodo são referidas como *plantas de dias neutros*. **Plantas de dias neutros (DNPs;** do inglês, *Day-neutral plants*) são insensíveis ao comprimento do dia. O florescimento em DNPs está tipicamente sob regulação autônoma, isto é, controle do desenvolvimento interno. Algumas espécies de dias neutros, tais como *Phaseolus vulgaris* (feijão), evoluíram próximo ao equador, onde o comprimento do dia é constante ao longo do ano. Muitas plantas anuais de deserto, tais como *Castilleja chromosa* e *Abronia villosa*, germinam, crescem e florescem rapidamente sempre que existe com suficiente disponibilidade de água. Estas são também DNPs.

FIGURA 24.17 Mutante de tabaco *Maryland Mammoth* (direita), comparado com tabaco tipo selvagem (esquerda). Ambas as plantas foram cultivadas durante o verão em casa de vegetação (alunos de pós-graduação da Universidade de Wisconsin utilizados com escala) (R. Amasino).

As plantas monitoram o comprimento do dia pela medição do comprimento da noite

Sob condições naturais, os comprimentos do dia e da noite configuram um ciclo de 24 horas de luz e escuro. Em princípio, uma planta poderia perceber um comprimento crítico do dia pela medição da duração tanto da luz quanto do escuro. Grande parte do trabalho experimental nos primeiros estudos sobre o fotoperiodismo foi dedicado ao estabelecimento de qual parte do ciclo de luz-escuro é o fator de controle do florescimento. Os resultados mostraram que o florescimento das SDPs é determinado primariamente pela duração do escuro (Figura 24.19A). Foi possível induzir florescimento em SDPs com períodos de luz mais longos do que o valor crítico, desde que os mesmos fossem seguidos por noites suficientemente longas (Figura 24.19B). Da mesma forma, as SDPs não floresciam quando dias curtos eram seguidos por noites curtas.

Experimentos mais detalhados demonstraram que a contagem do tempo do fotoperíodo nas SDPs é uma questão de medição da duração do escuro. Por exemplo, o florescimento ocorreu somente quando o período de escuro excedeu 8,5 horas no carrapicho (*Xantium strumarium*) ou 10 horas em soja (*Glycine max*). A duração do escuro também mostrou-se importante nas LDPs (ver Figura 24.19). Estas plantas floresciam em dias curtos, desde que o comprimento da noite fosse também curto; contudo, um regime de dias longos seguidos por noites longas não surtia efeito.

Quebras da noite podem cancelar o efeito do período de escuro

Uma característica que demonstra a importância do período de escuro é que ele pode se tornar não-efetivo pela interrupção com uma curta exposição à luz, chamada de **quebra da noite** (ver Figura 24.19A). Por outro lado, a interrupção de um dia longo com um breve período de escuro não cancela o efeito do dia longo (ver Figura 24.19B). Tratamentos de quebra da noite de apenas poucos minutos são efetivos no *impedimento* do florescimento de muitas SDPs, incluindo *Xantium* e *Pharbitis*, mas exposições muito mais longas são necessárias para *promover* o florescimento em LDPs.

Além disso, o efeito de uma quebra da noite varia grandemente de acordo com a hora em que é aplicado. Para LDPs e SDPs, uma quebra da noite é mais efetiva quando aplicada próximo à metade de um período de escuro de 16 horas (Figura 24.20).

A descoberta do efeito da quebra da noite e sua dependência do tempo teve várias conseqüências importantes. Ela estabeleceu o papel central do período de escuro e forneceu um meio de investigação valioso para o estudo do controle do tempo fotoperiódico. Pelo fato de apenas pequenas quantidades de luz serem necessárias, tornou-se possível estudar a ação e a identidade do fotorreceptor sem a interferência dos efeitos das fotossíntese e outros fenômenos não-fotoperiódicos. Esta descoberta levou também ao

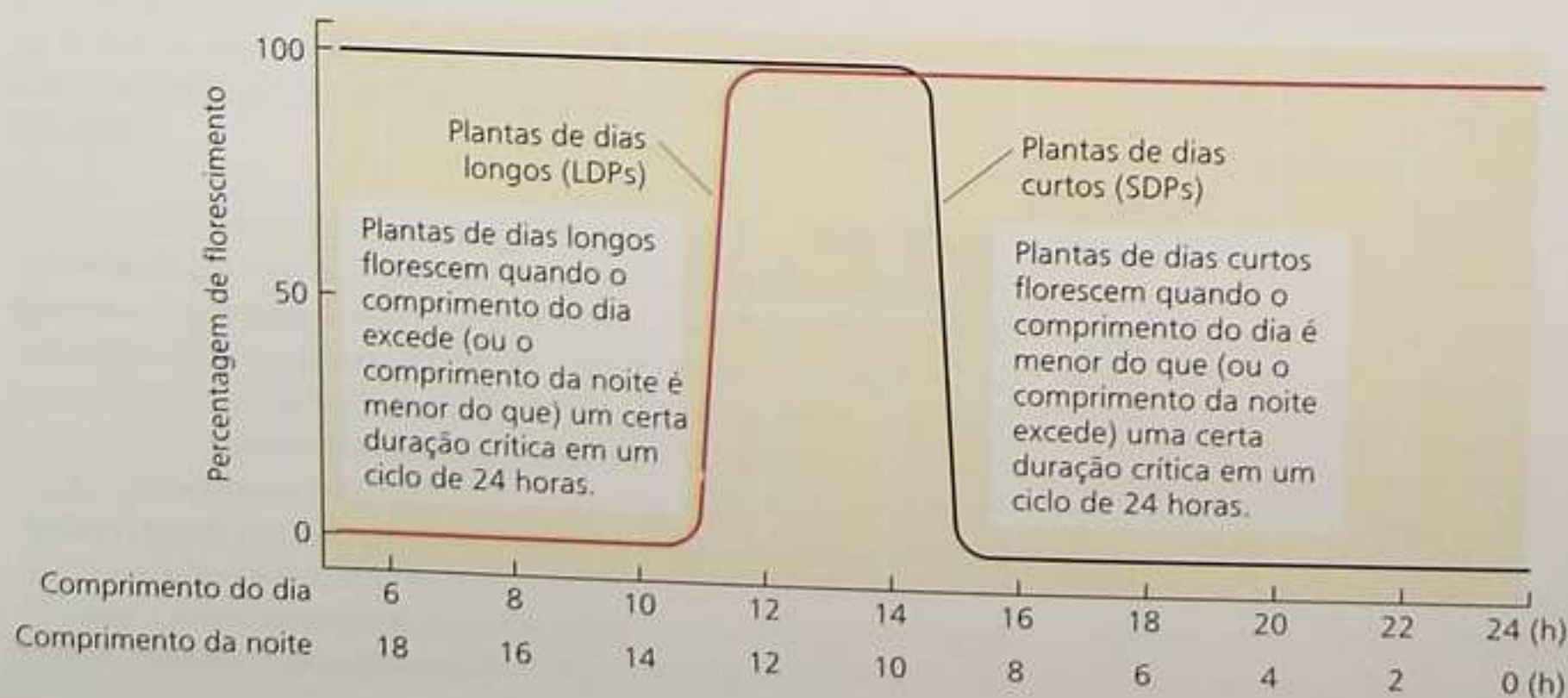



FIGURA 24.18 A resposta fotroperiódica em plantas de dias longos e plantas de dias curtos. A duração crítica varia com a espécie: neste exemplo, as SDPs e as LDPs floresceriam em fotoperíodos entre 12 e 14 horas.

(A)

Plantas de dias curtos

Plantas de dias curtos (noites longas) florescem quando o comprimento da noite excede um período crítico de escuro. A interrupção do período de escuro por um breve tratamento de luz (uma quebra da noite) impede o florescimento.

Plantas de dias longos

Plantas de dias longos (noites curtas) florescem se o comprimento da noite é mais curto do que um período crítico. Em algumas plantas de dias longos, o encurtamento da noite com uma quebra de noite induz o florescimento.

(B)

Tratamento de luz	SDP	LDP
	Florescimento	Vegetativa
	Vegetativa	Florescimento
	Vegetativa	Florescimento
	Vegetativa	Florescimento
	Vegetativa	Florescimento
	Florescimento	Vegetativa

FIGURA 24.19 A regulação fotoperiódica do florescimento. (A) Efeitos sobre SDPs e LDPs. (B) Efeitos da duração do período de escuro sobre o florescimento. O tratamento de plantas de dias curtos e longos com fotoperíodos diferentes mostra claramente que a variável crítica é o comprimento do período escuro.

desenvolvimento de métodos comerciais para a regulação do momento do florescimento em espécies hortícolas, tais como *Kalanchoe*, *Chrysanthemum* e poinsétia (*Euphorbia pulcherrima*).

O relógio circadiano está envolvido no controle fotoperiódico do tempo

O efeito decisivo do comprimento da noite no florescimento indica que a medição da passagem do tempo no escuro é uma peça central no monitoramento do tempo fotoperiódico. Muitas das evidências disponíveis favorecem de um mecanismo baseado em um ritmo circadiano (Bünning, 1960). De acordo com a **hipótese do relógio,** o monitoramento do tempo fotoperiódico depende de um oscilador circadiano endógeno do tipo envolvido nos ritmos diários descritos no Capítulo 17 em relação ao fitocromo. O oscilador central está acoplado a vários processos fisiológicos que envolvem expressão gênica, incluindo o florescimento em espécies fotoperiódicas.

As medições do efeito de uma quebra da noite no florescimento podem ser usadas para investigar o papel do ritmo circadiano no monitoramento do tempo fotoperiódico. Por exemplo, quando plantas de soja, que são SDPs, são transferidas de um período de oito horas de luz para um período estendido de escuro de 64 horas, a resposta de florescimento a quebras da noite mostra um ritmo circadiano (Figura 24.21).

Este tipo de experimento fornece forte suporte para a hipótese do relógio. Se estas SDPs estivessem simplesmente medindo o comprimento da noite pelo acúmulo de um intermediário em particular durante o período de escuro, qualquer período de escuro maior do que o comprimento crítico da noite deveria causar florescimento. Entretanto, longos períodos de escuro não são indutivos para o florescimento, se a quebra da noite for aplicada em um

FIGURA 24.20 O momento em que uma quebra da noite é aplicada determina a resposta de florescimento. Quando aplicada durante um período de escuro longo, uma quebra da noite promove o florescimento em LDPs e inibe o florescimento em SDPs. Em ambos os casos, o maior efeito sobre o florescimento ocorre quando a quebra da noite é aplicada próxima à metade do período de escuro de 16 horas. A LDP *Fuchsia* foi aplicada uma hora de exposição à luz vermelha em um período de escuro de 16 horas. *Xanthium* foi exposto à luz vermelha por um minuto em um período de escuro de 16 horas (dados para *Fuchsia*, de Vince-Prue, 1975; dados para *Xanthium*, de Salisbury, 1963, e Papenfuss e Salisbury, 1967).

momento que não coincida propriamente com uma certa fase do oscilador circadiano endógeno. Esta descoberta demonstra que o florescimento em SDPs requer um período de escuro com duração suficiente e um sinal de amanhecer em um momento apropriado dentro do ciclo circadiano (ver Figura 24.15).

Mais evidências para o papel do oscilador circadiano na medição do fotoperíodo é a observação que a resposta fotoperiódica pode ter sua fase alterada por tratamentos de luz (ver **Tópico 24.4 na Internet**).

O modelo de coincidência é baseado em fases oscilantes de sensibilidade à luz

O envolvimento de um oscilador circadiano no fotoperiodismo levanta uma questão importante: como uma oscilação com um período de 24 horas mede uma duração crítica de escuro de oito a nove horas, conforme acontece na SDP *Xanthium*? Erwin Bünning propôs, em 1936, que o controle do florescimento pelo fotoperiodismo é alcançado por uma oscilação de fases com diferentes sensibilidades à luz. Esta proposta evoluiu para o **modelo de coincidência** (Bünning, 1960), no qual o oscilador circadiano controla o momento de ocorrência das fases sensível e insensível à luz.

A capacidade da luz de promover ou inibir o florescimento depende da fase na qual a luz é aplicada. Quando um sinal luminoso é administrado durante a fase sensível à luz do ritmo, o efeito é tanto de *promover* o florescimento nas LDPs ou de *evitar* o florescimento nas SDPs. Como foi mostrado na Figura 24.21, as fases de sensibilidade e insensibilidade à luz continuam a oscilar no escuro nas SDPs. O florescimento nas SDPs é induzido somente quando a exposição à luz, de uma quebra da noite ou do amanhecer, ocorre após a fase do ritmo sensível à luz ter sido completada. Em outras

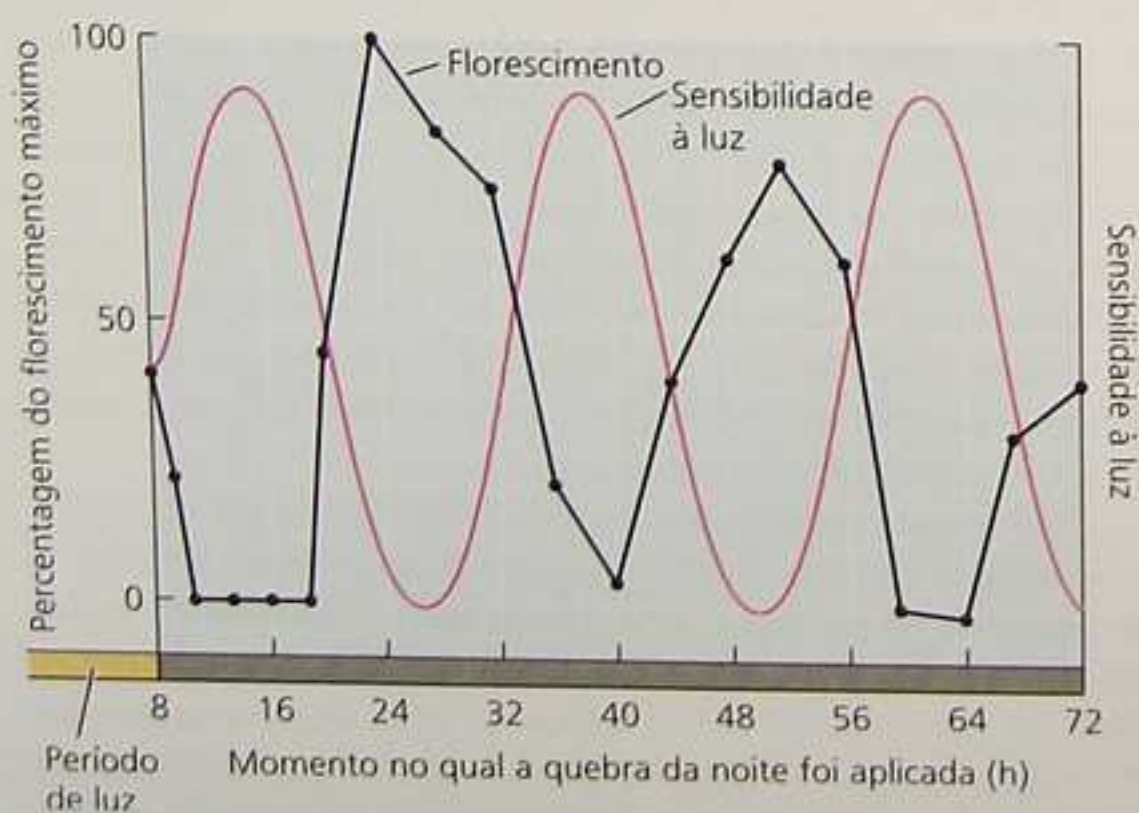



FIGURA 24.21 Florescimento rítmico em resposta a quebras da noite. Neste experimento, a SDP soja (*Glycine max*) recebeu ciclos de oito horas de luz seguidos de períodos de 64 horas de escuro. Uma quebra da noite de quatro horas foi aplicada em vários momentos durante o longo período de escuro indutivo. A resposta de florescimento, plotada como uma percentagem do máximo, foi então plotada para cada quebra da noite aplicada. Observar que uma quebra da noite aplicada a 26 horas induziu o florescimento máximo, enquanto não houve florescimento quando a quebra da noite foi aplicada a 40 horas. Além disso, este experimento demonstra que a sensibilidade ao efeito de uma quebra da noite apresenta um ritmo circadiano. Os dados citados suportam um modelo no qual o florescimento em SDPs é induzido somente quando o amanhecer (ou uma quebra da noite) ocorrer após completada a fase sensível à luz. Nas LDPs o momento da iluminação tem de coincidir com a fase sensível à luz para que ocorra o florescimento (Coulter e Hamner, 1964).

palavras, *o florescimento é induzido quando a exposição à luz coincide com a fase apropriada do ritmo*. Esta oscilação continuada das fases sensível e insensível na ausência de sinais de luz de amanhecer ou entardecer é característica de uma variedade de processos controlados pelo oscilador circadiano.

A folha é o sítio de percepção do estímulo fotoperiódico

O estímulo fotoperiódico em LDPs e SDPs é percebido pelas folhas. Por exemplo, o tratamento de uma única folha da SDP *Xanthium* com curtos fotoperíodos é suficiente para causar a formação de flores, mesmo quando o resto da planta está exposto a dias longos. Assim, em resposta ao fotoperíodo, a folha transmite um sinal que regula a transição para o florescimento no ápice da parte aérea. Os processos regulados pelo fotoperíodo, que ocorrem nas folhas, resultando na transmissão do estímulo floral para o ápice do ramo, são referidos coletivamente como **indução fotoperiódica.**

A indução fotoperiódica pode ocorrer em uma folha que tenha sido separada da planta. Por exemplo, na SDP *Perilla crispa*, uma folha excisada exposta a dias curtos pode causar florescimento quando enxertada a uma planta não induzida mantida sob dias longos (Zeevaart e Boyer, 1987). Tal resultado indica que a indução fotoperiódica depende de eventos que ocorrem exclusivamente na folha.

Os experimentos com enxertia, que contribuíram significativamente para a compreensão que se tem do estímulo floral, serão discutidos em maior detalhe mais adiante neste capítulo.

O estímulo floral é transportado via floema

Uma vez produzido, o estímulo floral parece ser transportado ao meristema via floema, parecendo ser de natureza química, e não física. Os tratamentos que bloqueiam o transporte no floema, tais como anelamento ou a morte por aquecimento localizado (ver Capítulo 10), impedem o movimento do sinal floral.

É possível medir as taxas de movimento do estímulo floral por meio da remoção da folha em momentos diferentes após a indução e pela comparação do tempo necessário para o sinal atingir duas gemas localizadas em distâncias diferentes da folha induzida. O raciocínio por trás deste tipo de medição é que uma quantidade mínima do composto de sinalização atingiu a gema quando o florescimento ocorre, mesmo após a remoção da folha.

Estudos utilizando este método demonstraram que a taxa de transporte do sinal de florescimento é comparável a, ou pouco mais lenta que, a taxa de translocação de açúcares no floema (ver Capítulo 10). Por exemplo, a exportação do estímulo floral de folhas adultas da SDP *Chenopodium* é completada dentro de 22,5 horas a partir do início do período de noite longa. Na LDP *Sinapsis*, o movimento do estímulo floral para fora da folha é completado em um período de 16 horas após o início de um tratamento de dia longo. Estas taxas são consistentes com um estímulo floral que se move no floema (Zeevaart, 1976).

Por ser o estímulo floral translocado juntamente com os açúcares no floema, ele está sujeito às relações de fonte-dreno. Uma folha induzida posicionada próxima ao ápice do caule tem maior probabilidade de causar florescimento que uma folha induzida na base do caule, que normalmente alimenta as raízes. Da mesma forma, as folhas não-induzidas posicionadas entre folhas induzidas e a gema apical tendem a inibir o florescimento por servirem de fontes preferenciais para as gemas, impedindo, assim, o estímulo floral da folha induzida mais distal de atingir seu alvo. Esta inibição também explica a razão pela qual uma quantidade mínima de fotossíntese é exigida pela folha induzida para operar a translocação.

O fitocromo é o fotorreceptor primário no fotoperiodismo

Experimentos de quebra da noite são adequados para o estudo da natureza dos fotorreceptores envolvidos na recepção dos sinais de luz durante a resposta fotoperiódica. A inibição do florescimento em SDPs por quebras da noite foi um dos primeiros processos fisiológicos que mostraram estar sob controle do fitocromo (Figura 24.22).

Em muitas SDPs, uma quebra da noite torna-se efetiva somente quando a dose de luz aplicada for suficiente para saturar a fotoconversão do Pr (fitocromo que absorve a luz vermelha) a Pfr (fitocromo que absorve a luz vermelho-distante) (ver Capítulo 17). Uma exposição subseqüente à luz vermelho distante, a qual fotoconverte o pigmento de volta para a forma fisiologicamente inativa Pr, restaura a resposta de florescimento.

Em algumas LDPs, a reversibilidade no vermelho e no vermelho-distante foi também demonstrada. Nessas plantas, uma quebra da noite com luz vermelha promove o florescimento e uma exposição subseqüente à luz vermelho distante impede esta resposta.

Os espectros de ação para a inibição e a restauração da resposta de florescimento em SDPs são mostrados na Figura 24.23. Um pico de 660 nm, ponto de máxima absorção do Pr (ver Capítulo 17), é obtido quando plântulas de *Pharbitis* cultivadas no escuro são utilizadas para evitar a interferência da clorofila. Por outro lado, os espectros para *Xanthium* dão um exemplo da resposta em plantas verdes, nas quais a presença da clorofila pode causar alguma discrepância entre o espectro de ação e o espectro de absorção do Pr. Estes espectros de ação e a reversibilidade entre luz vermelha e vermelho distante confirmam o papel do fitocromo como o fotorreceptor que está envolvido na medição do fotoperíodo nas SDPs.

Em LDPs o papel dos fitocromos é mais complexo e um fotorreceptor de luz azul (que será discutido em seguida) também tem papel no controle do florescimento.

A luz vermelho-distante modifica o florescimento em algumas LDPs

Os ritmos circadianos foram também detectados nas LDPs. Um ritmo circadiano na promoção do florescimento pela luz vermelho-distante foi observado em cevada (*Hordeum vulgare*) e *Arabidopsis* (Deitzer, 1984), bem como em *Lolium temulentum* (Figura 24.24). A resposta é proporcional à irradiância e à duração da luz-vermelho-distante e é, assim, uma resposta de alta irradiância (HIR). Como em outras HIRs, o PHYA é o fitocromo que medeia a resposta à luz vermelho-distante (ver Capítulo 17). Em ambos os casos, quando a planta é exposta à luz-vermelho distante por quatro a seis horas, o florescimento é estimulado em comparação com plantas mantidas sob luz branca ou vermelha contínua — uma resposta mediada pelo PHYB. O ritmo continua o seu curso na luz.

Por outro lado, nas SDPs uma característica marcante do mecanismo de medição do tempo é que o ritmo da resposta à luz vermelho-distante tende a desaparecer após algumas horas sob iluminação contínua e é reiniciado quando a planta é transferida para o escuro.

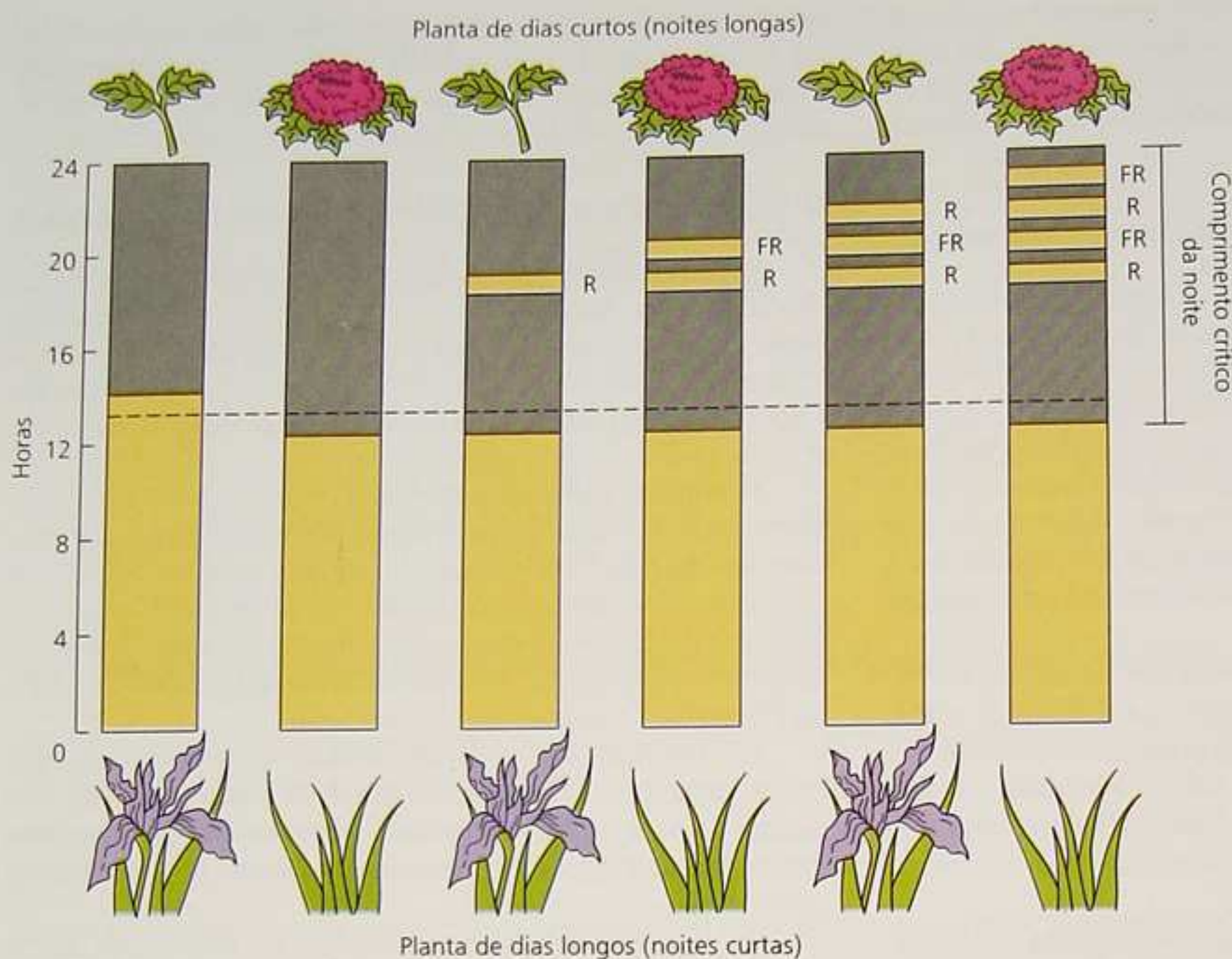



FIGURA 24.22 Controle do florescimento por fitocromo pela luz vermelha (R) e vermelho-distante (FR). Um *flash* de luz vermelha durante o período de escuro induz o florescimento em uma LDP, sendo o efeito revertido por um *flash* de luz vermelho-distante. Tal resposta indica o envolvimento do fitocromo. Em SDPs, um *flash* de luz vermelha evita o florescimento, sendo o efeito revertido por um *flash* de luz vermelho-distante.

A resposta à luz vermelho-distante não é a única característica rítmica nas LDPs. Embora relativamente insensíveis a uma quebra da noite de poucos minutos, muitas LDPs podem ser induzidas a florescer com uma quebra da noite mais longa, geralmente de pelo menos uma hora. Uma oscilação circadiana na resposta do florescimento a uma quebra longa da noite foi observada em LDPs, mostrando que um ritmo de responsividade à luz continua a se manifestar no escuro.

Assim, ritmos circadianos que modificam resposta de florescimento nas LDPs foram demonstrados ocorrer tanto na luz (promovido pela luz vermelho-distante) quanto no escuro (promovido pela luz vermelha ou branca). Entretanto, ainda não se sabe como o ritmo circadiano é acoplado à resposta fotoperiódica.

Um fotorreceptor de luz azul também regula o florescimento

Em algumas LDPs, como *Arabidopsis*, a luz azul pode promover o florescimento, sugerindo a possível participação de um fotorreceptor de luz azul no controle do florescimento. O papel da luz azul no florescimento e sua relação com os ritmos circadianos

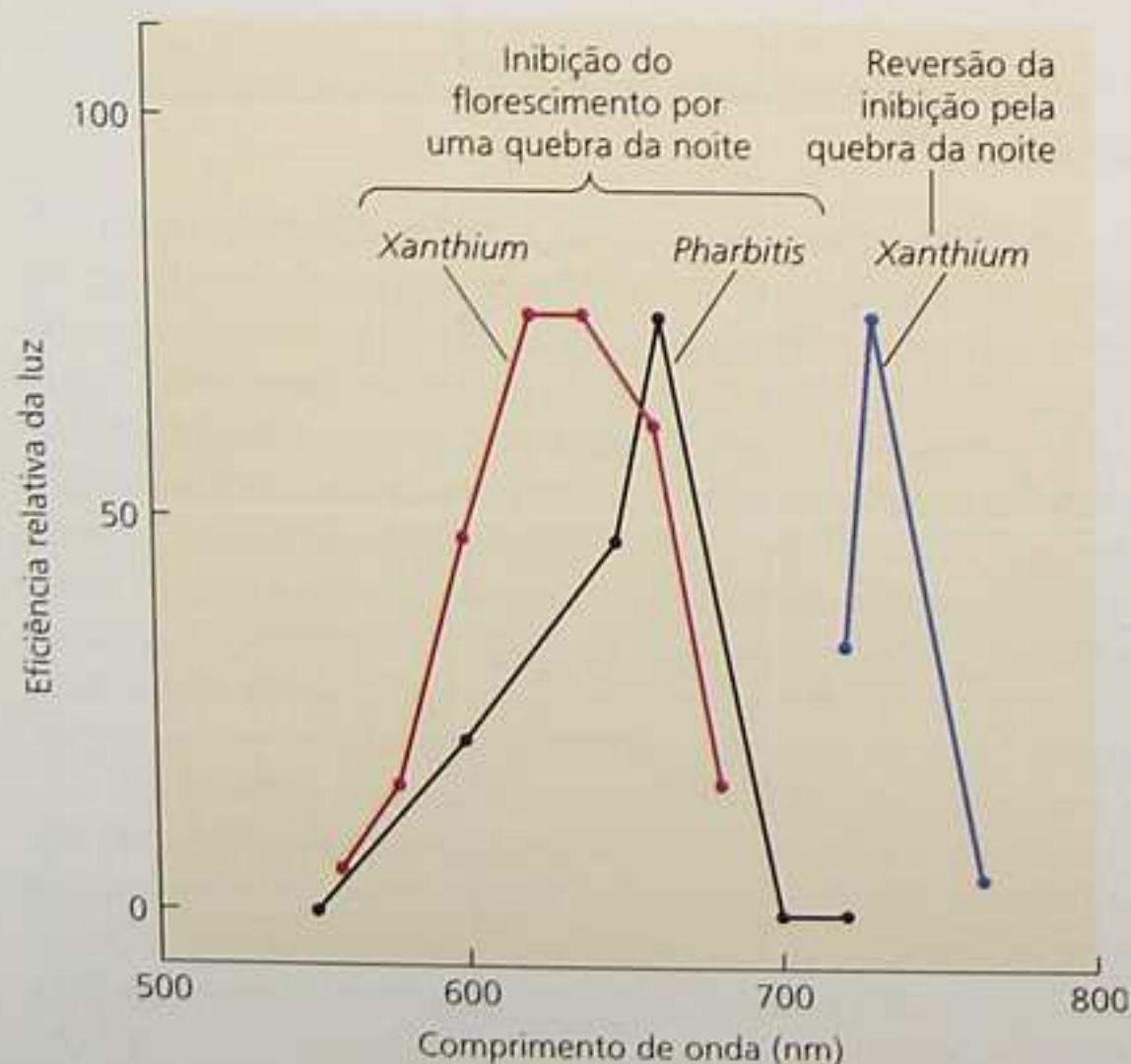



FIGURA 24.23 O espectro de ação para o controle do florescimento por quebras da noite mostra o envolvimento do fitocromo. O florescimento nas SDPs é inibido por um curto tratamento de luz (quebra da noite) aplicado em um período que, em outras circunstâncias, seria indutivo. Na SDP *Xanthium strumarium*, quebras da noite por luz vermelha de 620 a 640 nm são as mais efetivas. A reversão do efeito é máximo a 750 nm. Na SDP *Pharbitis nil* cultivada no escuro, a qual é destituída de clorofila e de sua interferência com a absorção da luz, quebras da noite de 660 nm são as mais efetivas. Este máximo de 660 nm coincide com o máximo de absorção do fitocromo (Dados para *Xanthium*, de Hendrics e Siegelman, 1967; dados para *Pharbitis*, de Saji e cols., 1983).

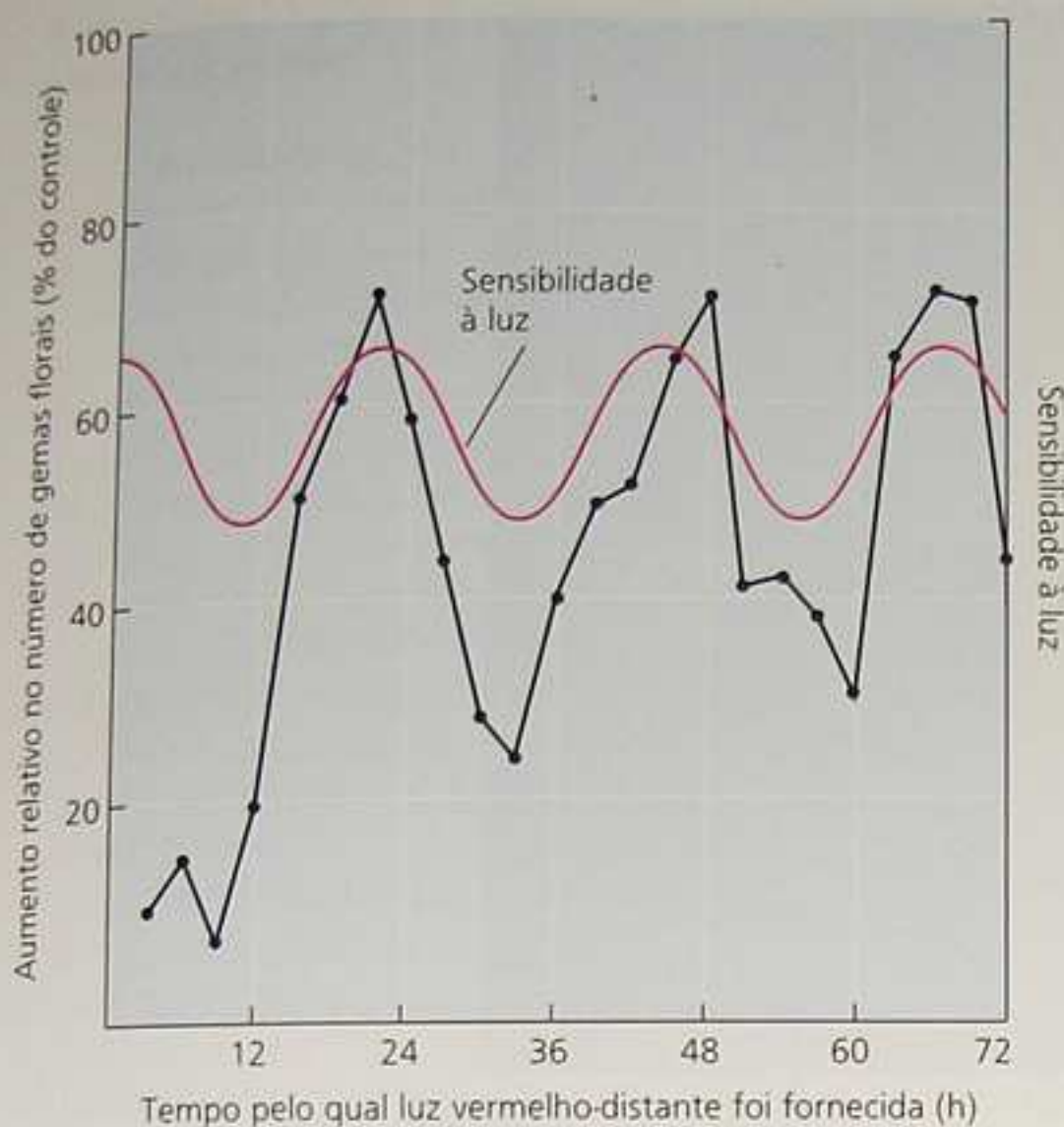



FIGURA 24.24 Efeito da luz vermelho-distante na indução floral em *Arabidopsis*. Quatro horas de luz vermelho-distante foram adicionadas nos tempos indicados durante um período de 72 horas de luz diurna. Os pontos no gráfico estão plotados nos centros dos tratamentos de seis horas. Os dados mostram um ritmo circadiano de sensibilidade para a promoção do florescimento pela luz vermelho-distante (linha vermelha), sustentando um modelo no qual o florescimento em LDPs é promovido quando o tratamento de luz (neste caso, luz vermelho-distante) coincide com o pico de sensibilidade à luz (Deitzer, 1984).

foram investigados pelo uso de uma construção gênica, empregando como gene-repórter o da luciferase mencionado no **Tópico 24.6 na Internet**. Sob luz branca contínua, a luminescência cíclica tem um período de 24,7 horas, mas, sob escuridão constante, o período aumenta para 30 a 36 horas. Tanto a luz vermelha quanto a azul, fornecidas individualmente, encurtam o período para 25 horas.

Para distinguir entre os efeitos do fitocromo e de um fotorreceptor de luz azul, os pesquisadores transformaram mutantes *hy1* deficientes em fitocromo, os quais têm síntese anormal de cromóforos e, portanto, são deficientes para *todos* os fitocromos (ver Capítulo 17), com a construção gênica da luciferase para determinar o efeito da mutação no comprimento do período (Millar e cols., 1995).

Sob luz branca contínua, as plantas *hy1* tiveram um período similar àquele do tipo selvagem, indicando que pouco ou nenhum fitocromo é exigido para que a luz branca afete a duração do período. Além do mais, sob luz vermelha contínua, que seria percebido apenas pelo PHYB (ver Capítulo 17), o período de *hy1* foi significativamente aumentado (isto é, ele se assemelhou mais às condições de escuridão), enquanto que o período não foi aumentado por luz azul contínua. Tais resultados indicam que tanto o fitocromo quanto o fotorreceptor de luz azul estão envolvidos no controle do período.

O papel da luz azul na regulação dos ritmos circadianos e do florescimento é também sustentado por estudos com um mutante de tempo de florescimento de *Arabidopsis*: *elf3* (florescimento precoce 3; do inglês, *early flowering* 3) (ver **Tópicos 24.5** e **24.6 na Internet**). A confirmação de que um fotorreceptor de luz azul está envolvido na percepção de fotoperíodos indutivos em *Arabidopsis* foi recentemente fornecida por experimentos que demonstraram que mutações em um dos genes do criptocromo, *CRY2* (ver Capítulo 18) provocaram um retardo no florescimento e uma imcapacidade de perceber fotoperíodos indutivos (Guo e cols., 1998). Conforme discutido no Capítulo 18, *CRY1* codifica um fotorreceptor de luz azul, que controla o crescimento de plântulas de *Arabidopsis*. Assim, vários membros da família *CRY1* tornaram-se, pela evolução, especializados em diferentes funções nas planta. Conforme salientado anteriormente, a proteína CRY também tem sido associada ao ajuste do oscilador circadiano (ver Capítulo 17).

VERNALIZAÇÃO: PROMOVENDO O FLORESCIMENTO COM O FRIO

A **vernalização** é o processo pelo qual o florescimento é promovido por um tratamento de frio dado a uma semente completamente hidratada (isto é, uma semente que foi embebida em água) ou a uma planta em crescimento. Sem o tratamento de frio, as plantas que exigem a vernalização mostram retardo no florescimento ou permanecem vegetativas. Em muitos casos, tais plantas crescem como rosetas, com nenhum alongamento caulinar (Figura 24.25).

Nesta seção, serão examinadas algumas características da exigência de frio para o florescimento, incluindo a amplitude e a duração das temperaturas indutivas, os locais de percepção, a relação com o fotoperiodismo e um possível mecanismo molecular.

A vernalização resulta em competência para o florescimento no meristema apical do caule

As plantas diferem grandemente quanto à idade na qual elas se tornam sensíveis à vernalização. As anuais de inverno, como as formas de inverno dos cereais (que são semeadas no outono e florescem no verão seguinte), respondem a baixas temperaturas bastante cedo em seus ciclos de vida. Elas podem ser vernalizadas antes da germinação, se as sementes foram embebidas em água e se tornarem metabolicamente ativas. Outras plantas, incluindo a maioria das bienais (que crescem como rosetas durante a primeira estação após a semeadura e florescem no verão seguinte), precisam atingir um tamanho mínimo antes de se tornarem sensíveis a baixas temperaturas para a vernalização.

A faixa efetiva de temperatura para a vernalização vai de um pouco abaixo da temperatura de congelamento até cerca de 10 °C, com uma ampla faixa ótima entre 1 e 7 °C (Lang 1965). O efeito do frio aumenta com a duração do tratamento de frio até que a resposta fique saturada. A resposta usualmente requer várias semanas de exposição a baixas temperaturas, mas a duração precisa varia amplamente com a espécie e com a variedade.

A vernalização pode ser perdida como resultado da exposição a condições de desvernalização, como altas temperaturas (Figura 24.26), mas quanto maior for a exposição a baixas temperaturas, mais permanente será o efeito da vernalização.

A vernalização parece ocorrer principalmente no meristema apical do caule. O resfriamento localizado causa o florescimento,

Arabidopsis anual de inverno sem vernalização

Arabidopsis anual de inverno com vernalização

FIGURA 24.25 A vernalização induz o florescimento nos tipos anuais de inverno de *Arabidopsis thaliana*. A planta na esquerda é anual de inverno não exposta ao frio. A planta à direita é anual de inverno, geneticamente idêntica, que foi exposta a 40 dias de temperaturas um pouco acima do congelamento (4 °C), como plântula. Ela floresceu três semanas após o término do período de frio, com cerca de nove folhas no caule primário (cedidas por Colleen Bizzell).

quando apenas o ápice caulinar é resfriado, efeito que parece ser muito independente da temperatura à qual o resto da planta foi submetido. Ápices caulinares excisados foram vernalizados com sucesso e, onde a vernalização da semente é possível, fragmentos de embrião consistindo essencialmente do ápice caulinar são sensíveis a baixas temperaturas.

Em termos de desenvolvimento, a vernalização resulta na aquisição da competência do meristema de realizar a transição floral. Ainda, conforme o que já foi discutido no capítulo, a competência para florescer não assegura que o florescimento vá ocorrer. Uma exigência de vernalização é atrelada com freqüência a uma exigência de um fotoperíodo específico (Lang, 1965). A combinação mais comum é uma exigência de tratamento de frio, seguida por uma exigência de dias longos — uma combinação que leva ao florescimento no começo do verão nas grandes latitudes (ver **Tópico 24.7 na Internet**). A não ser que seja desvernalizado, o meristema vernalizado pode permanecer competente para florescer por um período tão longo quanto 300 dias, na ausência de um fotoperíodo indutivo.

Percentagem de sementes que permanecem vernalizadas depois do tratamento de desvernalização

100

80

60

40

20

0

2 4 6 8

Duração do tratamento de frio (semanas)

FIGURA 24.26 A duração da exposição a baixas temperaturas aumenta a estabilidade do efeito da vernalização. Quanto mais tempo o centeio de inverno (*Secale cereale*) é exposto ao tratamento de frio, maior é o número de plantas que permanecem vernalizadas quando o tratamento de frio é seguido por um tratamento de desvernalização. Neste experimento, as sementes de centeio embebidas em água foram expostas a 5 °C por diferentes períodos de tempo e, então, imediatamente submetidas a um tratamento de desvernalização por três dias a 35 °C (Purvis e Gregory, 1952).

A vernalização pode envolver mudanças epigenéticas na expressão gênica

É importante observar que, para a vernalização ocorrer, um metabolismo ativo é necessário durante o tratamento de frio. Fontes de energia (açúcares) e oxigênio são requeridos, e temperaturas abaixo do congelamento que suprimem a atividade metabólica não são efetivas para a vernalização. Além disso, a divisão celular e a replicação do DNA também parecem ser necessárias.

Um modelo de como a vernalização afeta a competência é que ocorrem mudanças estáveis no padrão de expressão gênica no meristema, após o tratamento de frio. As mudanças na expressão gênica, que são estáveis mesmo após o sinal indutor da mudança (neste caso o frio) ter sido removido, são conhecidas como **regulação epigenética.** As mudanças epigenéticas na expressão gênica em muitos organismos, de fermentos a mamíferos, normalmente exigem divisão celular e duplicação de DNA, como é o caso da vernalização.

O envolvimento da regulação epigenética no processo de vernalização foi confirmado na LDP *Arabidopsis*. Em ecótipos anuais de inverno de *Arabidopsis*, que requerem tanto vernalização quanto dias longos para florescerem, um gene que atua como repressor do florescimento foi identificado: *LOCUS C DE FLORESCIMENTO* (*FLC*). O *FLC* é fortemente expresso em meristemas apicais do caule não vernalizados (Michaels e Amasino, 2000). Após a vernalização, este gene é desligado epigeneticamente por um mecanismo desconhecido, pelo resto do ciclo de vida da planta, permitindo que ocorra o florescimento em resposta a dias longos (Figura 24.27). Na próxima geração, no entanto, o gene é novamente ligado, restaurando a necessidade de frio. Assim, em *Arabidopsis*, o estado de expressão do gene *FLC* representa um determinante importante da competência dos meristemas (Michaels e Amasino, 2000).

SINALIZAÇÃO BIOQUÍMICA ENVOLVIDA NO FLORESCIMENTO

Nas seções anteriores, foi examinada a influência das condições ambientais (como temperatura e comprimento do dia) *versus* aquela de fatores autônomos (como idade) sobre o florescimento. Embora a evocação floral ocorra nos meristemas apicais das partes aéreas, alguns eventos que resultam na evocação floral são desencadeados por sinais bioquímicos que chegam ao ápice oriundos de outras partes da planta, especialmente das folhas. Mutantes deficientes no estímulo floral foram isolados (ver **Tópico 24.6 na Internet**).

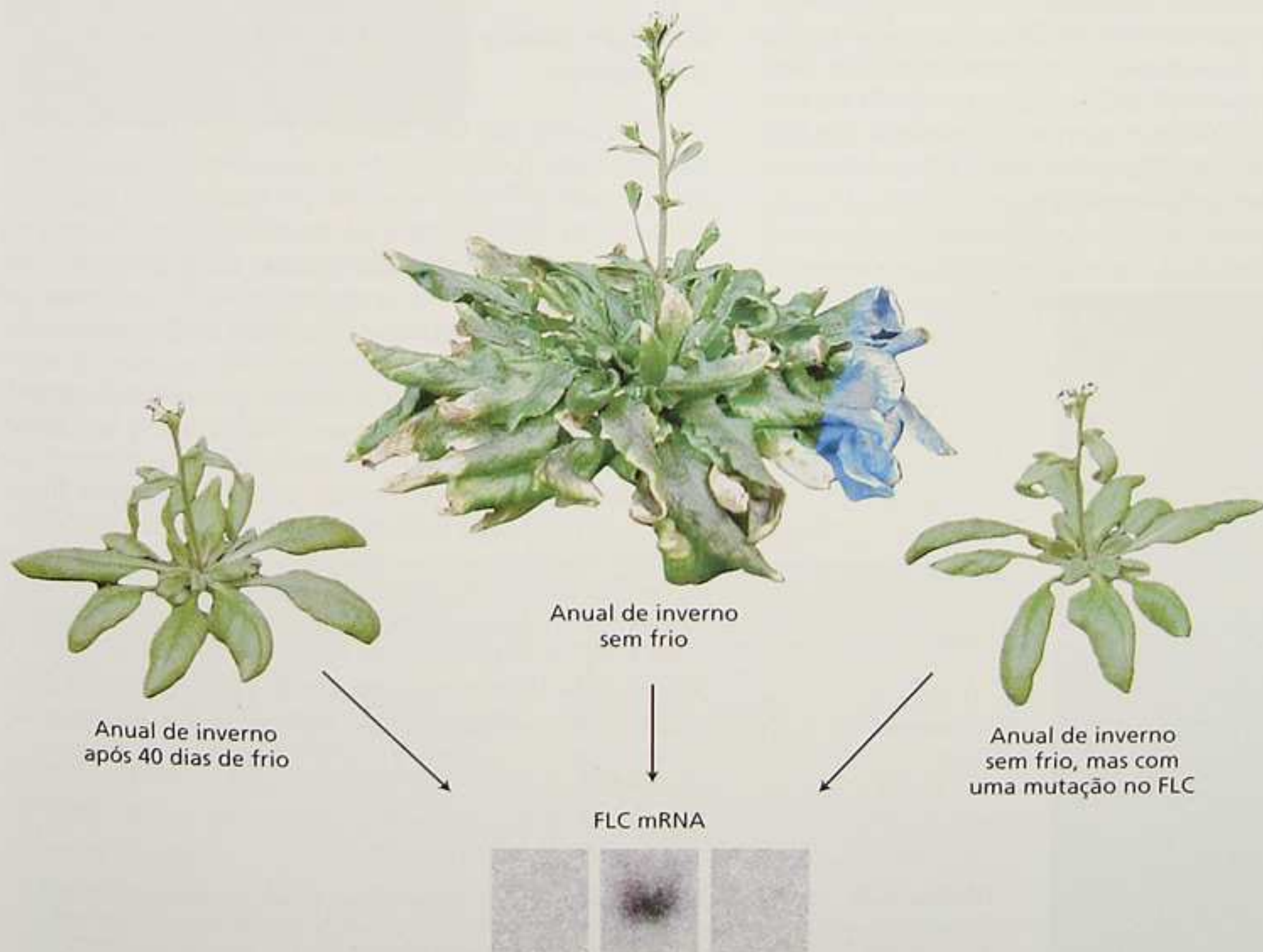



FIGURA 24.27 (Esquerda) A vernalização bloqueia a expressão do gene *LOCUS C DE FLORESCIMENTO* (*FLC*) em ecótipos anuais de inverno de *Arabidopsis* que requerem frio. (Direita) Uma anual de inverno com uma mutação em *FLC* exibe florescimento precoce sem tratamento de frio (cedido por R. Amasino).

Nesta seção, será considerada a natureza dos sinais bioquímicos que chegam das folhas e de outras partes da planta em resposta ao estímulos fotoperiódicos. Esses sinais podem servir como ativadores ou como inibidores do florescimento. Depois de anos de investigação, nenhuma substância foi identificada como sendo o estímulo floral universal, embora certos hormônios, como giberelinas e etileno, possam induzir o florescimento em algumas espécies. Assim, a maioria dos modelos atuais do estímulo floral baseia-se em múltiplos fatores.

Os estudos de enxertia geraram evidências de um estímulo floral transmissível

A produção, em folhas induzidas fotoperiodicamente, de um sinal bioquímico que é transportado para um tecido-alvo distante (o ápice caulinar), onde ele estimula uma resposta (florescimento), satisfaz um importante critério para efeito hormonal. Na década de 1930, Mikhail Chailakhyan, trabalhando na Rússia, postulou a existência de um hormônio universal de florescimento, que ele denominou de **florígeno.**

A evidência que apóia o florígeno vem, principalmente, de experimentos pioneiros de enxertia, nos quais plantas receptoras não-induzidas foram estimuladas a florescer ao receberem enxerto de uma folha ou caule de plantas doadoras fotoperiodicamente induzidas. Por exemplo, na SDP *Perilla crispa*, um membro da família das mentas, o enxerto de uma folha de uma planta cultivada sob dias curtos indutivos em uma planta cultivada sob dias longos não indutivos causou o florescimento na última (Figura 24.28). Além do mais, o estímulo floral parece ser o mesmo em plantas com diferentes necessidades fotoperiódicas. Assim, o enxerto de uma folha induzida da LDP *Nicotiana sylvestris*, cultivada sob dias longos, na SDP *Maryland Mammoth*, fez com que a última florescesse sob condições não indutivas (dias longos).

As folhas de DNPs também mostraram produzir um estímulo floral transmissível por enxertia (Tabela 24.2). Por exemplo, o enxerto de uma única folha de uma variedade neutra de soja, *Agate*, na variedade de dias curtos, *Biloxi*, causou florescimento em *Biloxi*, mesmo quando a última foi mantida sob dias longos não indutivos. Da mesma forma, uma folha de uma variedade neutra de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. *Trapezond*) enxertada na LDP *Nicotiana sylvestris* induziu a última a florescer sob dias curtos não indutivos.

Em alguns poucos casos, o florescimento foi induzido por enxertos entre gêneros diferentes. Um porta-enxerto vegetativo da SDP *Xanthium strumarium* floresceu sob condições de dias longos, quando foi enxertado com ramos em flor de *Calendula officinalis*. Da mesma forma, enxertando um ramo da LDP *Petunia hybrida* em um porta-enxerto da bienal *Hyoscyamus niger* (meimendro), que requer frio, fez com que a última florescesse sob dias longos, embora ela não tivesse sido vernalizada (Figura 23.9).

Em *Perilla* (ver Figura 24.28), o movimento do estímulo floral de uma folha doadora ao porta-enxerto, por meio do ponto de união da enxertia, correlacionou-se fortemente com a translocação de assimilados marcados com ^{14}C do doador, e este movimento dependeu do estabelecimento da continuidade vascular através do ponto de união da enxertia (Zeevaart, 1976). Tais resultados confirmaram estudos anteriores de anelamento, que mostraram que o estímulo floral é translocado juntamente com fotoassimilados no floema.

A indução indireta implica que o estímulo floral se autopropaga

Pelo menos em três casos — *Xanthium* (SDP), *Bryophyllum* (SLDP) e *Silene* (LDP) — o estado induzido parece se autopropagar (Zeevaart, 1976). Isto significa que folhas jovens desenvolvidas na planta receptora, após ela ter siso induzida a florescer por uma folha doadora, podem elas mesmas ser usadas como folhas doadoras em experimentos de enxertia subseqüentes, mesmo que tais folhas nunca tenham sido submetidas a um fotoperíodo indutivo, fenômeno chamado de *indução indireta*.

É característico da indução indireta que a força do estímulo floral da folha doadora permaneça constante, mesmo após ter havido a enxertia em série de novos doadores a várias plantas (Figura 24.30A), sugerindo que o estado induzido, de alguma forma, propaga-se pela planta. Embora esta característica do estímulo floral tenha sido algumas vezes descrita como do tipo viral, é pouco provável que este estímulo possa se auto-replicar como um vírus. Em vez disto, o estímulo floral é provavelmente uma molécula que induz sua própria produção em um circuito de *feedback* positivo. No carrapicho (*Xanthium*), a remoção de todas as gemas da parte aérea bloqueia a indução indireta, indicando que o tecido meriste-

FIGURA 24.28 Demonstração, por enxertia, de um estímulo floral gerado na folha na SDP *Perilla*. (Esquerda) O enxerto de uma folha induzida de uma planta cultivada sob dias curtos em um ramo não-induzido fez com que os ramos axilares produzissem flores. A folha da doadora foi aparada para facilitar a enxertia e as folhas superiores do porta-enxerto foram removidas para promover a translocação no floema do enxerto para os ramos receptores. (Direita) Enxertando uma folha não induzida de uma planta cultivada sob LDs resultou na formação de apenas ramos vegetativos (cedida por J. A. D. Zeevaart).

FIGURA 24.29 Transferência bem-sucedida do estímulo floral entre diferentes gêneros: o enxerto (ramo da direita) é a LDP *Petunia hibrida* e o porta-enxerto é *Hyoscyamus niger* (meimendro) não-vernalizado. A combinação enxertada foi mantida sob LDs. (cedida por J.A. D. Zeevaart).

mático, ou talvez auxina, seja necessário para a propagação do estado induzido.

Por outro lado, a indução indireta não ocorre na SDP *Perilla*. Em *Perilla*, apenas a folha que de fato recebeu o fotoperíodo indutivo é capaz de transmitir o estímulo floral em um experimento de enxertia (ver Figura 24.30B). Desse modo, o estímulo floral em *Perilla* não se autopropaga como em *Xanthium*, *Bryophyllum* e *Silene*. Ou o mecanismo para um circuito de *feedback* positivo não está presente nas folhas de *Perilla* ou a translocação do estímulo floral restringe-se ao meristema, de modo que ele nunca entra nas folhas.

Ao contrário de *Xanthium*, que necessita da presença de uma gema para indução estável, as folhas de *Perilla* podem ser estavelmente induzidas, mesmo quando destacadas da planta. Uma vez induzidas, as folhas de *Perilla* não podem ser desinduzidas, podendo a mesma folha continuar a servir como doadora do estímulo floral em experimentos sucessivos de enxertia, sem qualquer redução da potência (Zeevaart, 1975).

A evidência de antiflorígeno foi encontrada em algumas LDPs

Os estudos de enxertia também indicaram a existência de inibidores transmissíveis na regulação do florescimento. Tais inibidores têm sido chamados de **antiflorígenos**, mas o antiflorígeno (como o florígeno) pode consistir de compostos múltiplos. Por exemplo, o enxerto de um ramo folioso não induzido da LDP *Nicotiana sylvestris* no cultivar *Trapezond* de tabaco, de dias neutros, suprimiu o florescimento na plantas de dias neutros sob condições de dias curtos, mas não sob condições de dias longos (Figura 24.31). Por outro lado, quando um doador não-induzido da SDP *Maryland Mammoth* foi enxertado em *Trapezond*, ele não teve nenhum efeito sobre o florescimento, sob condições de dias longos ou curtos. Este resultado e outros similares sugerem que as folhas de LDPs, mas não as de SDPs, produzem inibidores de florescimento sob condições não-indutivas.

TABELA 24.2
Fatores transmissíveis regulam o florescimento

Plantas doadoras mantidas sob condições indutoras do florescimento	Tipo de fotoperíodo[a,b]	Planta receptora vegetativa induzida a florescer	Tipo de fotoperíodo[a,b]
Helianthus annus	DNP em LD	*H. tuberosus*	SDP em LD
Nicotiana tabacum Delcrest	DNP em SD	*N. sylvestris*	LDP em SD
Nicotiana sylvestris	LDP em LD	*N. tabacum*	SDP em LD
Nicotiana tabacum Maryland Mammoth	SDP em SD	*N. sylvestris*	LDP em SD

Nota: A transferência bem-sucedida de um sinal de indução do florescimento por enxertia em plantas de diferentes grupos de resposta fotoperiódica mostra a existência de um hormônio floral transmissível, o qual é efetivo.
[a]LDPs = Plantas de dias longos; SDPs = plantas de dias curtos; DNPs = plantas de dias neutros.
[b]LD, dias longos; SD, dias curtos.

(A) A indução indireta pode ser demonstrada em experimentos de enxertia em série, em *Xanthium*.

Inflorescência masculina

Primeiro enxerto

Segundo enxerto

Terceiro enxerto

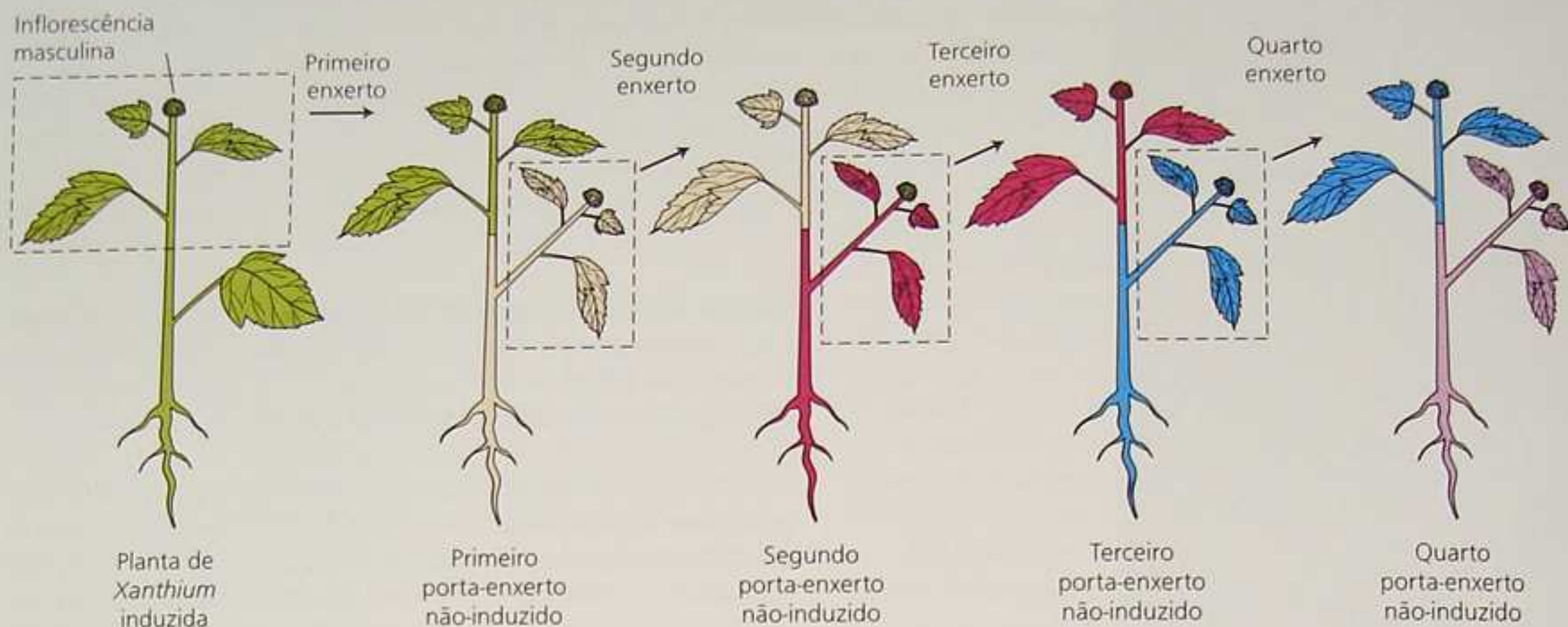
Quarto enxerto

Planta de *Xanthium* induzida

Primeiro porta-enxerto não-induzido

Segundo porta-enxerto não-induzido

Terceiro porta-enxerto não-induzido

Quarto porta-enxerto não-induzido

(B) A enxertia de folha induzida em ramo não-induzido provoca o florescimento em múltiplos enxertos, em *Perilla*.

Primeiro enxerto

Segundo enxerto

Terceiro enxerto

Planta induzida

Porta-enxerto não-induzido

Porta-enxerto não-induzido

Porta-enxerto não-induzido

Folhas não-induzidas, removidas do porta-enxerto para promover movimento fonte-dreno da folha induzida para a gema axilar

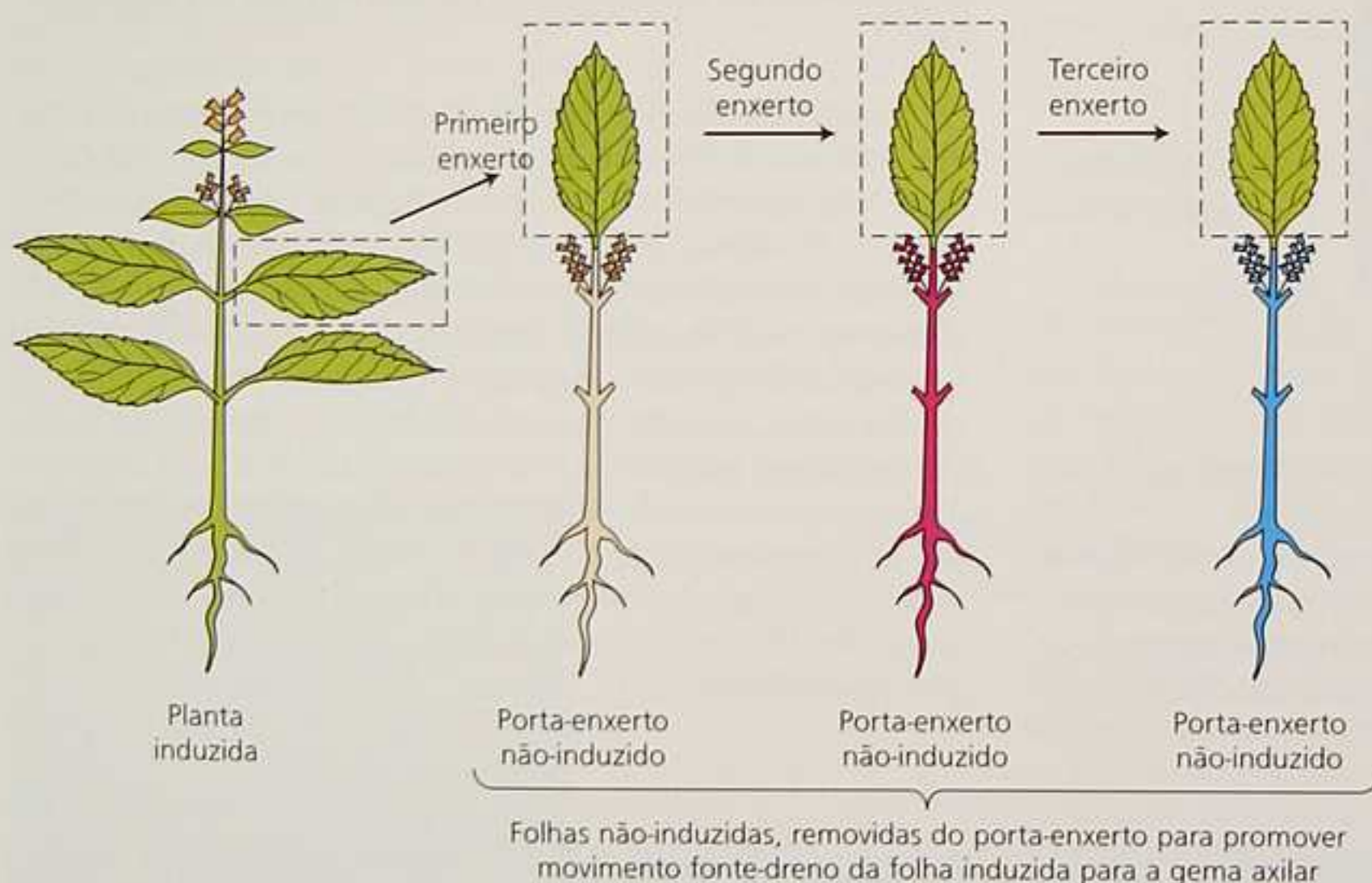



FIGURA 24.30 Diferentes tipos de indução foliar em *Xanthium* e *Perilla*. (A) *Xanthium* exibe indução indireta. Folhas não-induzidas de uma planta induzida a florescer são capazes de induzir outras plantas a florescer, mesmo que elas nunca tenham recebido um fotoperíodo indutivo, sugerindo que o estímulo floral se autopropaga (B) Em *Perilla*, apenas a folha que recebeu o fotoperíodo indutivo é capaz de servir como doadora para o estímulo floral. Em *Perilla*, bem como em *Xanthium*, uma folha pode continuar a induzir o florescimento em experimentos sucessivos de enxertia (Lang, 1965).

Estudos similares em ervilha levaram à identificação de vários *loci* que regulam etapas das rotas biossintéticas, tanto de ativadores quanto de inibidores florais (ver **Tópico 24.5 na Internet**).

As tentativas de isolar reguladores florais transmissíveis não foram bem-sucedidas

As várias tentativas de isolar e caracterizar o estímulo floral foram muito malsucedidas. A abordagem mais comum tem sido a de fazer extratos de tecido de folha induzida e testar a capacidade deles em fazer surgir o florescimento em plantas não-induzidas. Em outros experimentos, os pesquisadores extraíram e analisaram a seiva do floema de plantas induzidas. Em algumas pesquisas, os extratos de uma destas fontes induziu o florescimento em plantas-teste, mas tais resultados não foram consistentemente reproduzidos. A maioria destas extrações enfocou pequenas moléculas.

Estudos recentes usando rastreadores fluorescentes mostraram que em *Arabidopsis* ocorre, de fato, um *decréscimo* no movimento de pequenas moléculas da folha para o ápice caulinar via simplasto, por ocasião da indução floral (Gisel e cols., 2002). A falta de movimento do rastreador da folha para o ápice do caule pode indicar uma redução no transporte simplástico geral para o ápice caulinar ou uma mudança na seletividade dos plasmodesmas durante a indução floral. Existe evidência crescente de que o tráfico macromole-

FIGURA 24.31 Transmissão por enxerto de um inibidor do florescimento. Rosetas não-induzidas da LDP *Nicotiana sylvestris* foram enxertadas na planta de tabaco de dias neutros (*Nicotiana tabacum*, cultivar *Trapezond*). O florescimento da planta de dias neutros foi suprimido sob dias curtos (ramo da esquerda na planta da direita), mas não sob dias longos (ramo da esquerda na planta da esquerda). As setas indicam as uniões do enxerto (Lang e cols., 1977).

cular entre células, via plasmodesmas, desempenha papéis essenciais no desenvolvimento e funcionamento normais dos meristemas (ver Capítulo 16). Partículas tão grandes quanto vírus podem se mover de célula para célula via pasmodesmas e através da planta pelo floema. A translocação no floema de pequenos RNAs foi recentemente implicada na propagação de um mecanismo de resistência viral através de plantas (Hamilton e Baulcombe, 1999). Portanto, é possível que o estímulo floral seja uma macromolécula, como RNA ou proteína, que é translocada através do floema, da folha ao meristema apical, onde funciona como um regulador da expressão gênica (Crawford e Zambrysky, 1999). No entanto, até o momento as tentativas de identificar tal sinal foram malsucedidas.

Os esforços no sentido de isolar um inibidor do florescimento específico e transmissível por enxertia também foram malsucedidos. Assim, apesar dos dados inequívocos dos experimentos de enxertia, mostrando que fatores transmissíveis regulam o florescimento (ver Tabela 24.2) (Zeevaart, 1976), as substâncias envolvidas permanecem indefinidas.

Giberelinas e etileno podem induzir o florescimento em algumas plantas

Entre os hormônios de crescimento que ocorrem naturalmente, as giberelinas (GAs) (ver Capítulo 20) podem ter uma forte influência no florescimento (ver **Tópico 24.8 na Internet**). Estudos recentes sugerem que a giberelina promove o florescimento em *Arabidopsis*, ativando a expressão do gene *LFY* (Blazquez e Weigel, 2000). A giberelina exógena pode causar o florescimento, se aplicada em LDPs em roseta, como *Arabidopsis*, ou em plantas de comprimento de dia dual, como *Bryophyllum*, quando cultivadas sob dias curtos (Lang, 1965; Zeevaart, 1985).

Além disso, a aplicação de GAs pode desencadear o florescimento em algumas SDPs sob condições não-indutivas e em plantas que exigem frio e que não foram vernalizadas. Conforme discutido anteriormente, pela adição de GAs, a formação de cones também pode ser promovida em plantas juvenis de várias famílias de gimnospermas. Assim, em algumas plantas, GAs exógenas podem substituir o desencadeador endógeno de idade no florescimento autônomo, assim como os sinais ambientais primários de comprimento do dia e temperatura.

Conforme discutido no Capítulo 20, as plantas contêm muitos compostos do tipo GA. A maioria destes compostos é precursor ou metabólito inativo de formas ativas de GA. Em algumas situações, GAs diferentes têm efeitos marcantemente distintos sobre o florescimento e o alongamento do caule, como na planta de dias longos *Lolium temulentum* (ver **Tópico 24.9 na Internet**).

Estas observações sugerem que a regulação do florescimento pode estar associada a GAs específicas, mas elas não provam que GA é o hormônio hipotético do florescimento. De fato, um certo nível de GA é provavelmente exigido para o florescimento em algumas espécies, mas também são necessárias outras rotas para o florescimento. Uma mutação na síntese de GA, por exemplo, torna a LDP *Arabidopsis thaliana* incapaz de florescer em dias curtos não-indutivos, mas tem pouco efeito sobre o florescimento em dias longos, demonstrando que GA endógena é necessária para o florescimento em situações específicas (Wilson e cols., 1992).

Atenção considerável tem sido dada aos efeitos do comprimento do dia no metabolismo de GA (ver Capítulo 20). Por exemplo, em espinafre (*Spinacia oleracea*), uma espécie de dias longos, os níveis de giberelina são relativamente baixos sob dias curtos e as plantas mantêm a forma de roseta. Depois que as plantas são transferidas para dias longos, os níveis de todas as giberelinas da rota 13-hidroxilada ($GA_{53} \rightarrow GA_{44} \rightarrow GA_{19} \rightarrow GA_{20} \rightarrow GA_1$; ver Capítulo 20) aumentam. No entanto, o aumento de cinco vezes na giberelina fisiologicamente ativa, G_1, é que causa o pronunciado alongamento do caule que acompanha o florescimento.

Além das GAs, outros hormônios de crescimento podem inibir ou promover o florescimento. Um exemplo comercialmente importante é a notável promoção do florescimento no abacaxi (*Ananas comosus*), por etileno ou compostos liberadores de etileno — uma resposta que parece ser restrita a membros da família do abacaxi (*Bromeliaceae*). Assim, conforme discutido a seguir, o estímulo floral pode ser composto de vários componentes, e estes componentes podem diferir entre grupos distintos de plantas.

A transição para o florescimento envolve múltiplos fatores e rotas

Torna-se evidente que a transição para o florescimento envolve um sistema complexo de fatores que interagem, incluindo, entre outros, carboidratos, giberelinas, citocininas e, em bromeliáceas, etileno (ver **Tópico 24.10 na Internet**). Sinas transmissíveis gerados na folha são necessários para a determinação do ápice caulinar, tanto em espécies reguladas autonomamente quanto nas

fotoperiódicas. Determinar se tais sinais transmissíveis consistem de componentes simples ou múltiplos é um desafio importante para o futuro.

Estudos genéticos recentes estabeleceram que há quatro rotas de desenvolvimento distintas que controlam o florescimento na LDP *Arabidopsis* (Blazquez, 2000). A Figura 24.32 mostra uma versão simplificada das quatro rotas:

1. A *rota fotoperiódica* envolve fitocromos e criptocromos (observar que PHYA e PHYB têm efeitos contrastantes sobre o florescimento; ver **Tópico 24.11 na Internet**). A interação destes fotorreceptores com um relógio circadiano inicia uma rota que por fim resulta na expressão do gene *CONSTANS* (*CO*), que codifica um fator de transcrição do tipo "dedo-de-zinco" (do inglês, *zinc-finger*) promotor do florescimento. O *CO* atua por intermédio de outros genes, para aumentar a expressão do gene de identidade de meristema floral *LEAFY* (*LFY*).
2. Na *rota* dupla *autônoma/de vernalização*, o florescimento ocorre em resposta a sinais internos — a produção de um número fixo de folhas — ou a baixas temperaturas. Todos os genes associados à rota autônoma de *Arabidopsis* são expressos no meristema. A rota autônoma atua reduzindo a expressão do gene repressor do florescimento *LOCUS C DO FLORESCIMENTO* (*FLC*), um inibidor do *LFY* (Michaels e Amasino, 2000). A vernalização também reprime o *FLC*, mas talvez por um mecanismo diferente (um interruptor epigenético). Como o gene *FLC* é um alvo em comum, as rotas autônoma e de vernalização são agrupadas.
3. A *rota dos carboidrato* ou *da sacarose* reflete o estado metabólico da planta. A sacarose estimula o florescimento em *Arabidopsis* pelo aumento da expressão do *LFY*, embora a rota genética seja desconhecida.
4. A *rota das giberelinas* é necessária para o florescimento precoce ou para o florescimento sob dias curtos não-indutivos.

Todas as quatro rotas convergem, aumentando a expressão do gene-chave de identidade de meristema floral *AGAMOUS-LIKE*

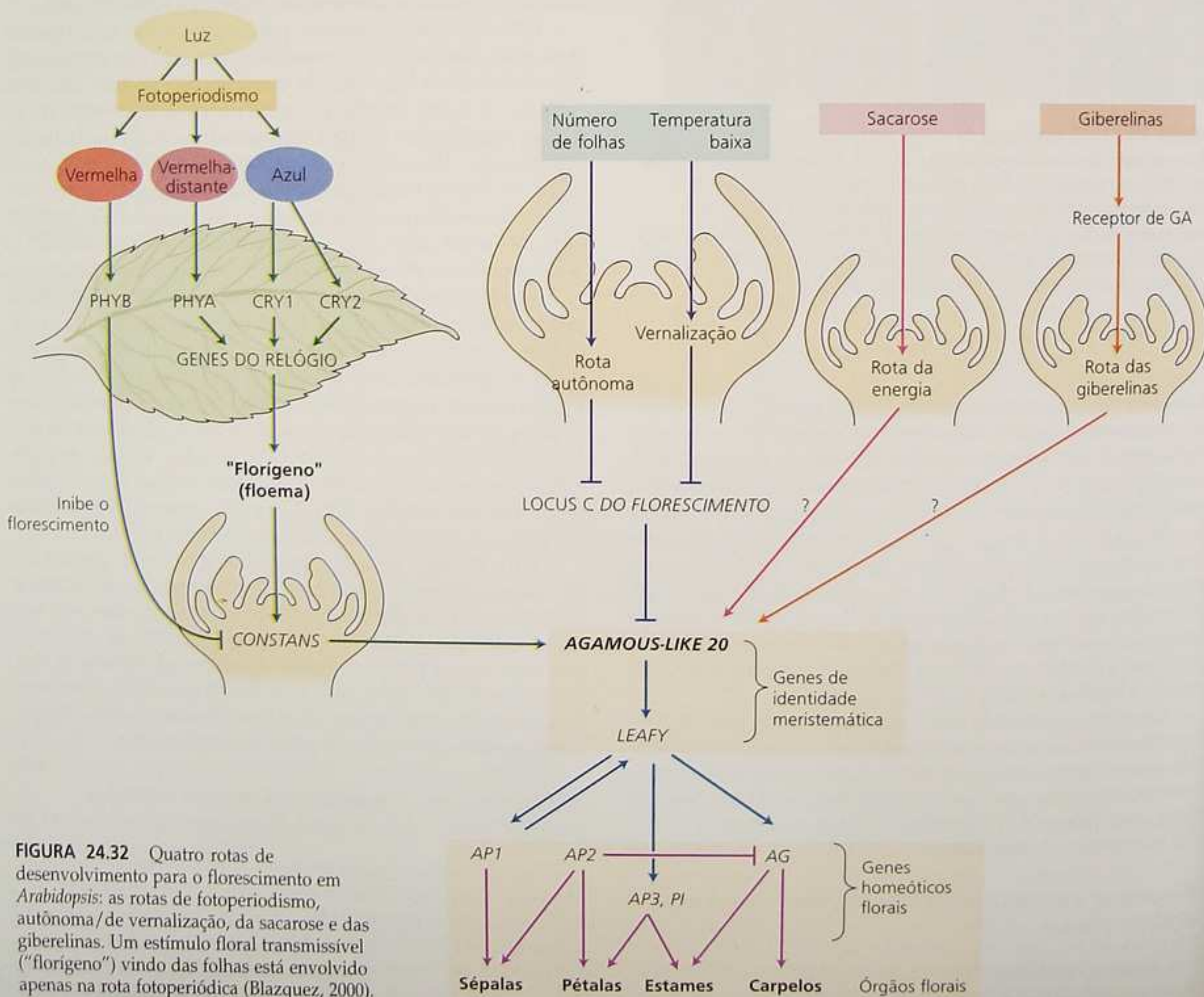



FIGURA 24.32 Quatro rotas de desenvolvimento para o florescimento em *Arabidopsis*: as rotas de fotoperiodismo, autônoma/de vernalização, da sacarose e das giberelinas. Um estímulo floral transmissível ("florígeno") vindo das folhas está envolvido apenas na rota fotoperiódica (Blazquez, 2000).

Dias curtos para dias longos no tempo 0

0 h 18 h 42 h 5 d

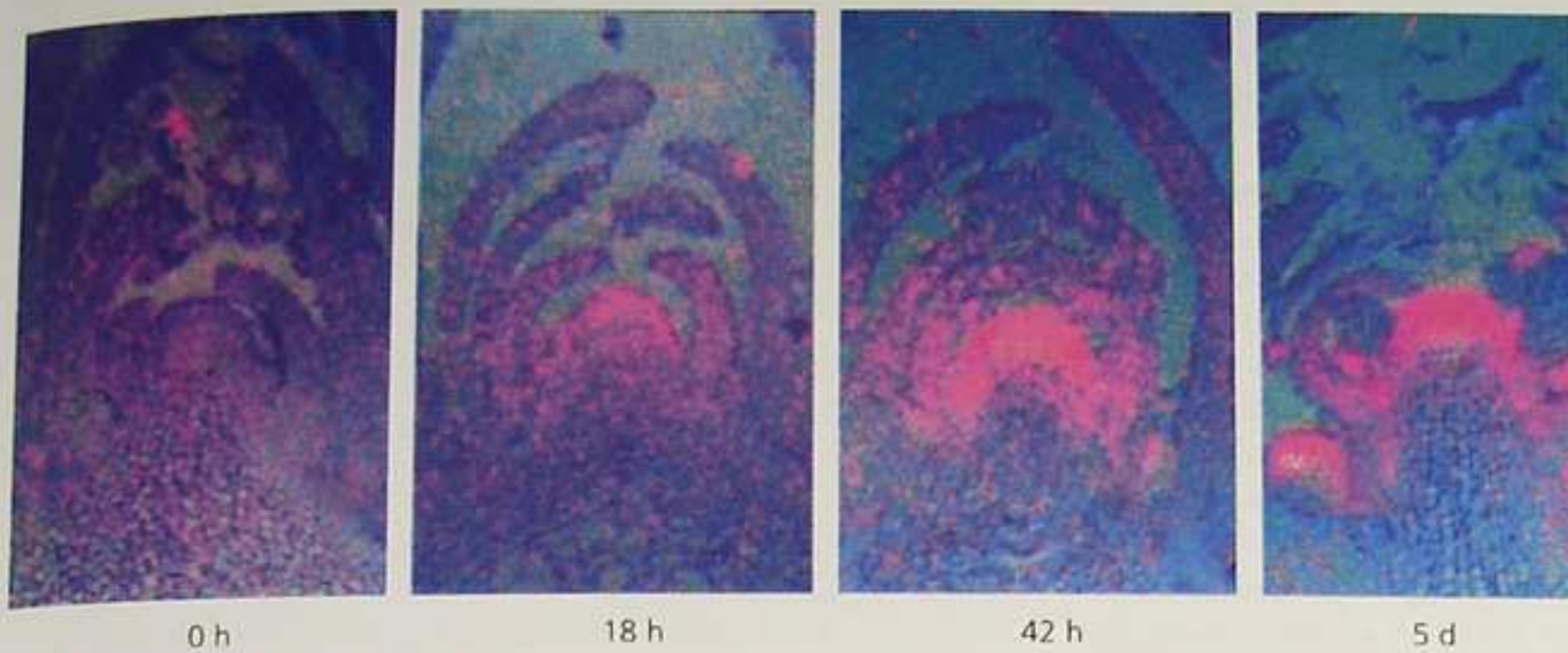



FIGURA 24.33 Aumento na expressão do gene *AGAMOUS-LIKE 20* (*AGL20*) durante o desencadeamento do florescimento no meristema apical do caule de *Arabidopsis*. Os tempos após a troca das plantas de SDs para LDs são indicados (Borner e cols., 2000).

20 (*AGL20*). O papel do *AGL20*, um fator de transcrição contendo MADS *box*, é integrar os sinais oriundos de todas as quatro rotas em um *output* unitário. Obviamente, o sinal de *output* mais forte ocorre quando todas as quatro rotas são ativadas.

A Figura 24.33 mostra o nível de expressão do gene *AGL20* no meristema apical do caule de uma planta de *Arabidopsis*, após mudança de dias curtos não-indutivos (comprimento do dia de oito horas) para dias longos indutivos (comprimento do dia de 16 horas). Observar que um aumento na expressão do *AGL20* pode ser detectado tão cedo quanto 18 horas após o começo do tratamento com dias longos (Borner e cols., 2000). Assim, são necessárias apenas 10 horas, além de um dia curto de oito horas, para que o meristema comece a responder ao estímulo floral vindo das folhas, tempo que é compatível com medidas anteriores das taxas de exportação do estímulo floral a partir de folhas induzidas (já discutido no capítulo).

Embora muitas rotas alimentem o *AGL20*, deve haver alguma redundância no sistema, pois o florescimento é apenas retardado, mas não completamente bloqueado em mutantes *agl*20. Desse modo, um ou dois genes devem ser capazes de assumir o papel do *AGL20*, quando ele sofre mutação.

Uma vez ligado pelo *AGL20*, o *LFY* ativa os genes homeóticos florais — *APETALA1* (*AP1*), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) e *AGAMOUS* (*AG*) — necessários ao desenvolvimento de órgãos florais. *APETALA2* (*AP2*) é expresso tanto em meristemas vegetativos quanto florais e não é, portanto, afetado pelo *LFY*. No entanto, conforme já discutido neste capítulo, o *AP2* exerce um efeito negativo na expressão do *AG* (ver Figura 24.6).

Além de servir como gene homeótico floral, o *AP1* funciona como um gene de identidade de meristemas em *Arabidopsis*, porque ele está envolvido em um circuito de *feedback* positivo com *LFY*. Conseqüentemente, uma vez que a transição para o florescimento atingiu este estágio, o florescimento é irreversível.

A existência de múltiplas rotas de florescimento proporciona às angiospermas um flexibilidade reprodutiva máxima, permitindo a elas produzir sementes sob uma ampla variedade de condições. A redundância dentro das rotas faz com que a reprodução, a função fisiológica mas crucial de todas, seja relativamente insensível a mutações e evolutivamente resistente.

Os detalhes das rotas, variam, sem dúvida, entre diferentes espécies. No milho, por exemplo, pelo menos um dos genes envolvidos na rota autônoma é expresso nas folhas (ver **Tópico 24.12 na Internet**). No entanto, a presença de múltiplas rotas de florescimento é provavelmente universal entre as angiospermas.

RESUMO

A formação da flor ocorre no meristema apical do caule e é um evento morfológico complexo. A *Arabidopsis*, uma planta rosetada, tem sido um importante modelo para o estudo do desenvolvimento floral. Os quatro órgãos florais (sépalas, pétalas, estames e carpelos) são formados como verticilos sucessivos. Três classes de genes regulam o desenvolvimento floral. A primeira classe contém reguladores positivos da identidade do meristema floral. *APETALA1* (*AP1*) e *LEAFY* (*LFY*) são os genes mais importantes de identidade de meristema floral de *Arabidopsis*.

Os genes de identidade de meristemas são reguladores positivos de uma outra classe de genes que determinam a identidade dos órgãos florais. Existem cinco genes de identidade de órgão floral conhecidos em *Arabidopsis*: *APETALA1* (*AP1*), *APETALA2* (*AP2*), *APETALA3* (*AP3*), *PISTILLATA* (*PI*) e *AGAMOUS* (*AG*). Os genes cadastrais formam o terceiro grupo. Os genes cadastrais atuam como reguladores espaciais dos genes de identidade de órgão floral, estabelecendo limites na expressão dos mesmos.

Os genes que controlam a identidade do órgão floral são homeóticos. A maioria dos genes homeóticos em plantas contém MADS *box*. As mutações nestes genes alteram a identidade dos órgãos florais produzidos em dois verticilos adjacentes. O modelo ABC procura explicar como os genes homeóticos florais controlam a identidade dos órgãos por meio das combinações singulares de seus produtos. Os genes tipo A controlam a identidade dos órgãos no primeiro e segundo verticilos. A atividade tipo B controla a determinação dos órgãos no segundo e terceiro verticilos. O terceiro e o quarto verticilos são controlados por atividade tipo C.

A capacidade de florescer (ou seja, de fazer a transição da juvenilidade para a maturidade) é alcançada quando a planta atinge uma determinada idade ou tamanho. Em algumas plan-

tas, a transição ao florescimento, então, ocorre independentemente do ambiente (de forma autônoma). Outras requerem a exposição a condições ambientais apropriadas. Os *inputs* ambientais mais comuns para o florescimento são comprimento do dia e temperatura.

A resposta ao comprimento do dia — fotoperiodismo — promove o florescimento em uma época específica do ano, sendo conhecidas diferentes categorias de respostas. O sinal fotoperiódico é percebido pela folha. A exposição a baixas temperaturas — vernalização — é exigida para o florescimento de algumas plantas, e esta exigência está freqüentemente vinculada a uma exigência de comprimento do dia. A vernalização ocorre no meristema apical do caule. O fotoperiodismo e a vernalização interagem de várias maneiras.

Os ritmos diários — ritmos circadianos — podem localizar um evento em um período específico do dia. O monitoramento do tempo nestes ritmos é baseado em um oscilador circadiano endógeno. Manter o ritmo no horário local depende da resposta de fase do ritmo aos sinais ambientais, destacando-se, o amanhecer e o entardecer.

As plantas de dias curtos florescem quando uma duração crítica de escuridão é excedida. As de dias longos florescem quando o comprimento do período escuro é menor do que um valor crítico. A luz fornecida por certos períodos durante o período de escuro, que sejam mais longos do que o período crítico — uma quebra da noite — impede o efeito do período de escuro. A luz também age sobre o oscilador circadiano para ajustar o ritmo fotoperiódico, um evento que é importante para o mensuração do tempo no escuro. O mecanismo fotoperiódico mostra algumas variação nas respostas a dias curtos e a dias longos, mas ambas parecem envolver o fitocromo e um oscilador circadiano.

Quando plantas fotoperiodicamente responsivas são induzidas a florescer por exposição a comprimentos do dia apropriados, as folhas enviam um sinal químico ao ápice para evocar o florescimento. Este sinal transmissível é capaz de causar o florescimento em plantas de diferentes grupos de resposta fotoperiódica. Em comprimentos de dia não-indutivos, um inibidor transmissível do florescimento pode ser produzido pelas folhas de LDPs.

Embora experimentos fisiológicos, especialmente de enxertia, indiquem a existência de um estímulo floral transmissível e, em alguns casos, de inibidores florais, a identidade química de tais fatores não é conhecida. Os hormônios vegetais de crescimento, sobretudo as giberelinas, podem modificar o florescimento em muitas plantas.

A transição para o florescimento é regulada por múltiplos sinais e múltiplas rotas. Em *Arabidopsis*, o florescimento é controlado por quatro rotas: a fotoperiódica, a autônoma/de vernalização, a da sacarose e a das GAs. Todas estas rotas convergem para regular os genes de identidade de meristemas *AGAMOUS-LIKE 20* (*AGL20*) e *LEAFY* (*LGY*). Por sua vez, *AGL20* e *LFY* regulam os genes homeóticos florais para produzir os órgãos florais. A existência de múltiplas rotas para o florescimento confere às angiospermas a flexibilidade de se reproduzirem sob uma variedade de condições ambientais, aumentando, assim, o seu desempenho evolutivo.

Material da Internet

Tópicos da Internet

24.1 Contrastando as características das fases juvenil e adulta da hera inglesa (*Hedera helix*) e do milho (*Zea mays*)
É apresentada uma tabela de características morfológicas juvenis *versus* adultas.

24.2 A regulação da juvenilidade pelos genes *TEOPOD* (*TP*) no milho
É discutido o controle genético da juvenilidade no milho.

24.3 O florescimento de meristemas juvenis enxertados em plantas adultas
A competência de meristemas juvenis de florescer pode ser testada em experimentos de enxertia.

24.4 Características da resposta de mudança de fase em ritmos circadianos
Os movimentos de pétalas em *Kalanchoe* foram utilizados para estudar ritmos circadianos.

24.5 Os genes que controlam a época de florescimento
É apresentada uma discussão dos genes que controlam diferentes aspectos da época de florescimento.

24.6 O suporte para o papel da regulação por luz azul dos ritmos circadianos
É discutido o papel do ELF3 em mediar os efeitos da luz azul na época de florescimento.

24.7 A regulação do florescimento na campânula (do inglês, *Canterbury Bell*) pelo fotoperíodo e vernalização
Dias curtos atuando sobre as folhas podem substituir a vernalização no ápice caulinar da campânula.

24.8 Exemplos de indução floral por giberelinas em plantas com diferentes exigências ambientais para o florescimento
Uma tabela do efeitos das giberelinas sobre plantas com exigências fotoperiódicas diferentes.

24.9 Os efeitos diferentes de duas giberelinas distintas sobre o florescimento (comprimeto da espiga) e alongamento (alongamento do caule).
GA_1 e GA_{32} têm efeitos diferentes sobre o florescimento de *Lolium*.

24.10 A influência das citocininas e das poliaminas no florescimento
Outros reguladores de crescimento, além das giberelinas, podem participar da resposta de florescimento.

24.11 Os efeitos contrastantes dos fitocromos A e B sobre o florescimento
Uma breve discussão dos efeitos do phyA e phyB sobre o florescimento em *Arabidopsis* e em outras espécies.

24.12 Um gene que regula o estímulo floral no milho
O gene INDETERMINATE 1 do milho regula a transição para o florescimento e é expresso em folhas jovens.

Referências bibliográficas

Bewley, J. D., Hempel, F. D., McCormick, S., and Zambryski, P (2000) Reproductive Development. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, B. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. L. Jones (eds.), American Society of Plant Biologists, Rockville, MD.

Blazquez, M. A. (2000) Flower development pathways. J. *Cell* Sci.113: 3547-3548.

Blazquez, M. A., and Weigel, D. (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis. Nature* 404: 889-892.

Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleissner, R., Wisman, E., Apel, K., and Melzer, S. (2000) A *MADS* domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis. Plant J.* 24: 591-599.

Bowman, J. L., Smyth, D. R., and Meyerowitz, E. M. (1989) Genes directing flower development in *Arabidopsis. Plant Cell* 1: 37-52.

Banning, E. (1960) Biological clocks. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 15:1-9.

Clark, J. R. (1983) Age-related changes in trees. *J. Arboriculture* 9: 201-205.

Coen, E. S., and Carpenter, R. (1993) The metamorphosis of flowers. *Plant Cell* 5:1175-1181.

Coulter, M. W., and Hamner, K. C. (1964) Photoperiodic flowering response of Biloxi soybean in 72 hour cycles. *Plant Physiol.* 39: 848-856.

Crawford, K., and Zambryski, P (1999) Phylem transport: Are you chaperoned? *Curr. Biol.* 9: 8281-8285.

Deitzer, G. (1984) Photoperiodic induction in long-day plants. In *Light and the Flowering Process, D. Vince-Prue, B.* Thomas, and K. E. Cockshull eds., Academic Press, New York, pp. 51-63.

Devlin, P. E, and Kay, S. A. (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12: 2499-2509.

Gasser, C. S., and Robinson-Beers, K. (1993) Pistil *development. Plant Cell* 5:1231-1239.

Gisel, A., Hempel, E D., Barella, S., and Zambryski, P (2002) Leaf-toshoot apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering *Arabidopsis. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 99: 1713-1717.

Guo, H., Yang, H., Mockler, T. C., and Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis photoreceptors. Science* 279: 1360-1363.

Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.

Hendricks S. B., and Siegelman, H. W. (1967) Phytochrome and photoperiodism in plants. *Comp. Biochem.* 27:211-235.

Lang, A. (1965) Physiology of flower initiation. In *Encyclopedia of Plant Physiology* (Old Series, Vol. 15), W. Ruhland, ed., Springer, Berlin, pp.1380-1535.

Lang, A., Chailakhyan, M. K., and Frolova, I. A. (1977) Promotion and inhibition of flower formation in a dayneutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA* 74:2412-2416.

McDaniel, C. N. (1996) Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 47:465-475.

McDaniel, C. N., Hartnett, L. K., and Sangrey, K. A. (1996) Regulation of node number in day-neutral *Nicotiana tabacum*: A factor in plant size. *Plant J.* 9: 56-61.

McDaniel, C. N., Singer, S. R., and Smith, S. M. E. (1992) Developmental states associated with the floral transition. *Dev. Biol.* 153: 59-69.

Michaels, S. D., and Amasino, R. M. 2000. Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant Cell Environ.* 23: 1145,-1154.

Millar, A. J., Carre, I. A., Strayer, C. A., Chua, N.-H., and Kay, S. A. (1995) Circadian clock mutants in *Arabidopsis* identified by luciferase imaging. *Science* 267: 1161-1163.

Papenfuss, H. D., and Salisbury, F. B. (1967) Aspects of clock resetting in flowering of *Xanthium. Plant Physiol.* 42: 1562-1568.

Poethig, R. S. (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923-930.

Purvis, O. N., and Gregory, F. G. (1952) Studies in vernalization of cereals. XII. The reversibility by high temperature of the vernalized condition in Petkus winter rye. *Ann. Bot.* 1: 569-592.

Reid, J. B., Murfet, I. C., Singer, S. R., Weller, J. L., and Taylor, S.A. (1996) Physiological genetics of flowering in *Pisum. Sem. Cell Dev. Biol.* 7: 455-463.

Saji, H., Vince-Prue, D., and Furuya, M. (1983) Studies on the photoreceptors for the promotion and inhibition of flowering in darkgrown seedlings of *Pharbitis nil Choisy. Plant Cell Physiol.* 67: 1183-1189.

Salisbury, F. B. (1963) Biological timing and hormone synthesis in flowering of *Xanthium. Planta* 49:518-524.

Simon, R., Igeno, M. I., and Coupland, G. (1996) Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis. Nature* 384: 59-62.

Vince-Prue, D. (1975) *Photoperiodism in Plants.* McGraw-Hill, London.

Weigel, D., and Meyerowitz, E. M. (1994) The ABCs of floral homeotic *genes. Cell* 78: 203-209.

Wilson, R. A., Heckman, J. W., and Sommerville, C. R. (1992) Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. *Plant Physiol. 100*: 403-408.

Yanovsky, M. J. and Kay. S. A. (2001) Signaling networks in the plant circadian rhythm. *Curr. Opinion in Plant Biol* 4: 429-135.

Yanovsky, M. J., Mazzella, M. A., Whitelam, G. C., and Casal, J. J. (2001) Resetting the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis. J. Biol. Rhythms* 16: 523-530.

Zeevaart, J. A. D. *(1976)* Physiology of flower formation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 27: 321-348.

Zeevaart, J. A. D. *(1985) Bryophyllum.* In *Handbook of Flowering*, Vol. II, A. H. Halevy, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 89-100.

Zeevaart, J. A. D. (1986) Perilla. In *Handbook of Flowering*, Vol. 5, A. H. Halevy, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 239-252.

Zeevaart, J. A. D., and Boyer, G. L. (1987) Photoperiodic induction and the floral stimulus in *Perilla.* In *Manipulation of Flowering*, J. G. Atherton, ed., Butterworths, London, pp. 269-277.

Capítulo

25 *Fisiologia do estresse*

EM CONDIÇÕES NATURAIS E AGRICULTÁVEIS, as plantas estão freqüentemente expostas ao estresse ambiental. Alguns fatores dessa natureza, como a temperatura do ar, por exemplo, podem se tornar estressantes em poucos minutos; enquanto outros, como o conteúdo de água no solo, podem levar dias ou até semanas e, ainda, fatores tais como as deficiências minerais no solo necessitam de meses para se manifestar. Estima-se que, devido ao estresse resultante de condições climáticas e edáficas (fatores abióticos), a produtividade de culturas agrícolas nos Estados Unidos constitui apenas 22% da produtividade potencial genética (Boyer, 1982).

Além disso, o estresse desempenha um papel importante na determinação de como o solo e o clima limitam a distribuição de espécies vegetais. Assim, a compreensão dos processos fisiológicos subjacentes aos danos provocados por estresse e dos mecanismos de adaptação e aclimatação de plantas a estresses ambientais é de grande importância para a agricultura e o meio-ambiente.

O conceito de estresse muitas vezes é usado de maneira inadequada. A terminologia, ademais, pode ser confusa, de modo que é importante iniciar a discussão com algumas definições. **Estresse** é em geral definido como um fator externo, que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta. O presente capítulo irá se ocupar dos fatores ambientais ou abióticos que produzem estresse em plantas, embora fatores bióticos, como ervas daninhas, patógenos e predação por insetos, por exemplo, possam também provocar estresse. Na maioria dos casos, o estresse é medido em relação à sobrevivência da planta, produtividade agrícola, crescimento (acumulação de biomassa) ou o processo primário de assimilação (absorção de CO_2 e de minerais), que estão relacionados ao crescimento geral.

O conceito de estresse está intimamente relacionado ao de **tolerância ao estresse**, que é a aptidão da planta para enfrentar um ambiente desfavorável. Na literatura, a expressão *resistência ao estresse* é freqüentemente empregada como sinônimo de *tolerância ao estresse*, embora a última expressão seja preferida. Observe que um ambiente estressante para um planta pode não o ser para outra. A ervilha (*Pisum sativum*) e a soja (*Glycine max*), por exemplo, crescem melhor a aproximadamente 20 e 30°C, respectivamente. Com o aumento da temperatura, a ervilha mostra sinais de estresse pelo calor muito mais cedo que a soja. Assim, a soja tem maior tolerância ao estresse pelo calor.

Se a tolerância aumenta como conseqüência de exposição anterior ao estresse, diz-se que a planta está **aclimatada.** A aclimatação pode ser distinguida da **adaptação**, que em geral se refere a um nível de resistência *geneticamente* determinado, adquirido por um processo de seleção durante muitas gerações. Infelizmente, o termo *adaptação* é, às vezes, utilizado na literatura para indicar *aclimatação*. Mais tarde, ver-se-á que a expressão gênica desempenha um papel importante na aclimatação.

A adaptação e a aclimatação ao estresse ambiental resultam de eventos integrados que ocorrem em todos os níveis de organização, desde o anatômico e morfológico até o celular, bioquímico e molecular. A murcha de folhas em resposta ao déficit hídrico, por exemplo, reduz a perda de água pela folha e a exposição à luz incidente, diminuindo, assim, o estresse pelo calor sobre as folhas.

As repostas da célula ao estresse incluem mudanças no ciclo e divisão celulares, mudanças no sistema de endomembranas e vacuolização, bem como alterações na arquitetura da parede celular. Tudo isso contribui para acentuar a tolerância das células ao estresse. Bioquimicamente, as plantas alteram o metabolismo de várias maneiras, para acomodar estresse ambiental, incluindo a produção de compostos osmorreguladores, tais como prolina e glicina betaína. Os eventos moleculares, ligando a percepção de um sinal de estresse às respostas genômicas que levam à tolerância, têm sido investigados exaustivamente nos últimos anos.

Neste capítulo, serão examinados estes princípios e as formas pelas quais as plantas se adaptaram e se aclimataram ao déficit hídrico, à salinidade, ao resfriamento, ao congelamento, ao calor e à deficiência de oxigênio na biosfera das raízes. A poluição do ar, uma fonte importante de estresse para as plantas, é discutida no Ensaio 25.1 na Internet. Embora seja conveniente examinar cada um desses fatores de estresse individualmente, a maioria está inter-relacionada, ao mesmo tempo em que um conjunto comum de respostas celulares, bioquímicas e moleculares acompanha muitos dos processos individuais de aclimatação e adaptação.

O déficit hídrico, por exemplo, muitas vezes está associado à salinidade na biosfera das raízes e ao estresse por calor nas folhas (resultante de diminuição do esfriamento evaporativo devido à baixa transpiração), enquanto o resfriamento e o congelamento levam a reduções na atividade hídrica e estresse osmótico. Será visto, igualmente, que as plantas muitas vezes apresentam tolerância cruzada, isto é, tolerância a um estresse induzida por aclimatação a outro. Esse comportamento faz com que mecanismos de resistência a vários estresses compartilhem muitas características em comum.

DÉFICIT HÍDRICO E RESISTÊNCIA À SECA

Nesta seção, serão examinados alguns mecanismos de resistência à seca, os quais estão divididos em vários tipos. Inicialmente, pode-se estabelecer a distinção entre **retardo da desidratação** (a capacidade de manter a hidratação do tecido) e **tolerância à desidratação** (a capacidade de funcionar enquanto desidratada), que são, às vezes, referidas como tolerância à seca sob potenciais hídricos alto e baixo, respectivamente. Nas publicações mais antigas, freqüentemente encontra-se a expressão *evitação à seca* (em vez de *tolerância à seca*), mas tal denominação é incorreta, pois seca é uma condição meteorológica, tolerada por todas as plantas que sobrevivem a ela e evitada por nenhuma. A terceira categoria, **escape da seca**, engloba as plantas que completam seu ciclo durante a estação úmida, antes do início da seca. Estas são as únicas que verdadeiramente evitam a seca.

Entre as que retardam a desidratação destacam-se aquelas que economizam e aquelas que despendem água. As que *economizam água* têm consumo moderado do líquido, conservando parte no solo para usar mais tarde em seu ciclo; as que *despendem água* apresentam consumo irrestrito, utilizando muitas vezes grandes quantidades. A algarobeira (*Prosopis* sp) é um exemplo de planta que despende água. Essa espécie, de sistema subterrâneo profundo, ocupa áreas semi-áridas no sudoeste dos Estados Unidos e, devido ao seu grande consumo de água, impede o restabelecimento de gramíneas que têm valor agronômico.

As estratégias de resistência à seca variam com as condições climáticas ou edáficas

A produtividade de plantas, limitada pela água (Tabela 25.1), depende da quantidade disponível deste recurso e da eficiência do seu uso pelo organismo (ver Capítulos 4 e 9). Uma planta capaz de obter mais água ou que tem maior eficiência no seu uso resistirá melhor à seca. Algumas plantas possuem adaptações, como os tipos fotossintéticos C_4 e CAM, que lhes permitem explorar ambientes mais áridos. Além disso, as plantas exibem mecanismos de aclimatação que são ativados em resposta ao estresse hídrico.

O **déficit hídrico** pode ser definido como todo o conteúdo de água de um tecido ou célula que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação. Quando o déficit hídrico apresenta evolução suficientemente lenta para permitir mudanças nos processos de desenvolvimento, o estresse hídrico tem vários efeitos sobre o crescimento, um dos quais é a limitação da expansão foliar. A área foliar é importante, porque em geral a fotossíntese é proporcional a ela. No entanto, a expansão foliar rápida pode afetar desfavoravelmente a disponibilidade de água.

Se a precipitação ocorre apenas durante o inverno e a primavera, sendo os verões secos, o crescimento inicial acelerado pode produzir áreas foliares grandes, rápido esgotamento da água e também pouca umidade residual no solo para completar seu ciclo de vida. Em tal situação, apenas produzirão sementes as plantas que têm alguma água disponível para reprodução mais tarde na esta-

TABELA 25.1
Produtividades dos cultivos de milho e de soja nos Estados Unidos

	Produtividade do cultivo (percentagem de uma média de 10 anos)		
Ano	Milho	Soja	
1879	104	106	
1980	87	88	Seca severa
1981	104	100	
1982	108	104	
1983	77	87	Seca severa
1984	101	93	
1985	112	113	
1986	113	110	
1987	114	111	
1988	80	89	Seca severa

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, 1989.

ção ou que complete seu ciclo de vida rapidamente antes do início da seca (exibindo escape da seca). Ambas as estratégias possibilitarão algum sucesso reprodutivo.

A situação é diferente se a precipitação de verão for expressiva, mas errática. Nesse caso, a planta com área foliar grande ou capaz de desenvolver área foliar grande muito rapidamente é mais apropriada para beneficiar-se de verões úmidos ocasionais. Uma estratégia de aclimatação em tais condições é a capacidade de crescimento vegetativo e florescimento por um período extenso. Tais plantas são chamadas de *indeterminadas* em seu hábito de crescimento, ao contrário das plantas *determinadas*, que desenvolvem números definidos de folhas e flores apenas em períodos muito curtos.

Nas discussões a seguir, serão examinadas várias estratégias de aclimatação, incluindo a inibição da expansão foliar, a abscisão foliar, o acentuado crescimento de raízes e o fechamento estomático.

A área foliar diminuída é uma resposta precoce adaptativa ao déficit hídrico

Com a diminuição do conteúdo de água da planta, suas células tipicamente contraem-se e as paredes afrouxam (ver Capítulo 3). Esse decréscimo de volume celular resulta em pressão de turgor menor e na subseqüente concentração de solutos nas células. A membrana plasmática torna-se mais espessa e mais comprimida, pois ela cobre uma área menor do que antes. Por ser a redução do turgor o mais precoce efeito biofísico significante do estresse hídrico, as atividades dependentes do turgor, como a expansão foliar e o alongamento de raízes, são mais sensíveis aos déficits hídricos (Figura 25.1).

A expansão foliar é um processo movido pelo turgor e extremamente sensível ao déficit hídrico. A expansão celular é descrita pela equação

$$GR = m(\Psi_p - Y) \qquad (25.1)$$

onde é a taxa de crescimento, Ψ_p é o turgor, Y é o limiar de amolecimento (a pressão abaixo da qual a parede celular resiste à deformação plástica ou irreversível) e m é a extensibilidade da parede (a reação da parede à pressão).

Esta equação mostra que um decréscimo do turgor causa um decréscimo da taxa de crescimento. Observe também que, além de mostrar que há redução da velocidade do crescimento quando o estresse diminui Ψ_p, a equação evidencia que Ψ_p necessita decrescer só até o valor de Y, não até zero, para eliminar a expansão. Em condições normais, Y é geralmente apenas 0,1 a 0,2 MPa menor do que Ψ_p, de modo que pequenas diminuições do conteúdo de água e turgor podem reduzir a velocidade do crescimento ou impedi-lo completamente.

O estresse hídrico diminui não apenas o turgor, mas também m e aumenta Y. A extensibilidade da parede (m) normalmente é maior quando a solução da parede celular é ligeiramente ácida. Em parte, durante o estresse ocorre decréscimo de m porque o pH da parede celular tipicamente se eleva. Os efeitos do estresse sobre Y não estão bem compreendidos; presumivelmente, eles envolvem mudanças estruturais complexas da parede celular (ver Capítulo 15) que podem não ser prontamente revertidas após a supressão do estresse. Plantas com déficit hídrico tendem a se tornar re-hidratadas à noite e, como conseqüência, ocorre um crescimento foliar substancial nesse período. Entretanto, devido às mudanças em

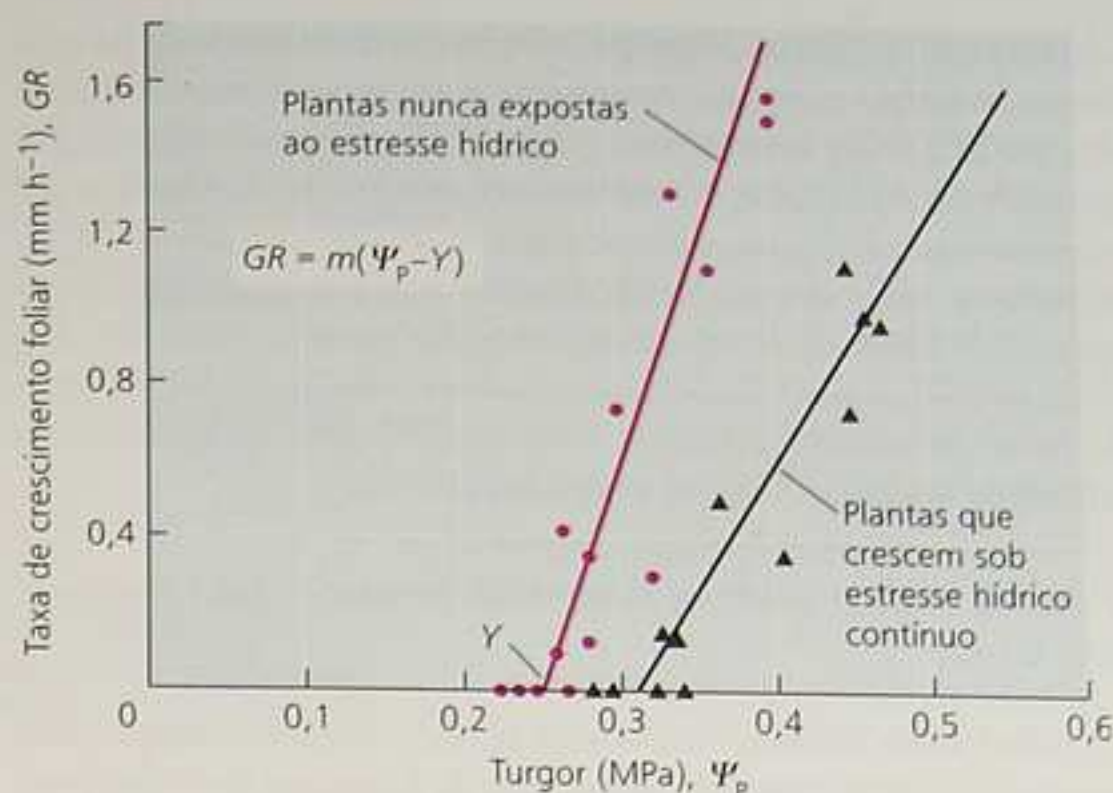



FIGURA 25.1 Dependência da expansão foliar em relação ao turgor. Indivíduos de girassol (*Helianthus annuus*) foram submetidos a condições de crescimento com amplo suprimento hídrico ou com água limitada no solo para produzir um estresse hídrico moderado. Após re-hidratação, as plantas dos dois grupos de tratamento foram estressadas por falta de água, sendo as taxas de crescimento foliar (*GR*) e o turgor (Ψ_p) medidos periodicamente. A redução da extensibilidade (m) e o aumento do limiar de turgor para crescimento (Y) limitam a capacidade de crescimento da folha após exposição ao estresse (Matthews e cols., 1984).

m e Y, a taxa de crescimento é ainda mais baixa do que a de plantas não-estressads que têm o mesmo turgor (ver Figura 25.1).

Como a expansão foliar depende principalmente da expansão celular, os princípios que fundamentam os dois processos são similares. A inibição da expansão celular provoca uma lentidão da expansão foliar no início do desenvolvimento de déficits hídricos. A área foliar menor transpira menos, conservando, efetivamente, um suprimento de água limitado no solo por um período mais longo. Assim, a redução da área foliar pode ser considerada a primeira linha de defesa contra a seca.

Em determinadas plantas, o estresse hídrico limita não apenas o tamanho, mas também o número de folhas, pois ele diminui o número e a taxa de crescimento dos ramos. O crescimento do caule tem sido menos estudado do que a expansão foliar, mas provavelmente ele é afetado pelas mesmas forças que limitam o crescimento das folhas durante o estresse.

Vale lembrar que as expansões celular e foliar também dependem de fatores bioquímicos e moleculares, além daqueles que controlam o fluxo de água. Um forte evidência sustenta a opinião que as plantas alteram suas taxas de crescimento em resposta ao estresse, por meio de um controle coordenado de muitos outros processos importantes, tais como a síntese da parede celular e de membranas, divisão celular e síntese protéica (Burssens e cols., 2000).

O déficit hídrico estimula a abscisão foliar

A área foliar total de uma planta (número de folhas × área de superfície de cada folha) não permanece constante depois de todas as folhas terem atingido a maturidade. Se as plantas sofrerem

um estresse hídrico após um desenvolvimento substancial da área foliar, as folhas sofrerão senescência e subseqüentemente cairão (Figura 25.2). Um ajustamento da área foliar é uma mudança importante a longo prazo, que beneficia a adequação da planta a um ambiente com limitação hídrica. De fato, muitas plantas de deserto perdem todas as suas folhas durante a seca e produzem novas após uma chuva. O ciclo pode ocorrer duas ou mais vezes em uma única estação. A abscisão durante o estresse hídrico resulta em grande parte da síntese acentuada e da sensibilidade ao etileno, um hormônio vegetal endógeno (ver Capítulo 22).

O déficit hídrico acentua o aprofundamento das raízes no solo úmido

Os déficits hídricos moderados também afetam o desenvolvimento do sistema subterrâneo. A razão da biomassa de raízes para a parte aérea parece ser governada por um balanço funcional entre absorção de água pelas raízes e fotossíntese pela parte aérea (ver Figura 23.6). Dito de maneira simplificada, *a parte aérea continuará crescendo até que a absorção de água pelas raízes torne-se limitante*; inversamente, *as raízes crescerão até que sua demanda por fotossintatos da parte aérea iguale-se ao suprimento*. Esse balanço funcional é alterado se o suprimento hídrico decrescer.

Conforme já apresentado, a expansão foliar é afetada muito precocemente, quando a absorção de água é reduzida. No entanto, a atividade fotossintética é muito menos atingida. A inibição da expansão foliar reduz o consumo de carbono e energia, e uma proporção maior de assimilados vegetais pode ser distribuída ao sistema subterrâneo, onde eles podem sustentar o crescimento posterior de raízes. Ao mesmo tempo, os ápices das raízes perdem turgor em solo seco.

Todos esses fatores levam a um crescimento preferencial das raízes em direção a zonas do solo que permanecem úmidas. Com o avanço dos déficits hídricos, as camadas superiores do solo são, em geral, as primeiras a secar. Assim, as plantas exibem um sistema de raízes predominantemente superficial, quando todas as camadas do solo estão umedecidas, e perda de raízes superficiais e proliferação de raízes profundas, quando a água é esgotada nas camadas superiores do solo. O crescimento de raízes mais profundas em direção ao solo úmido pode ser considerado uma segunda linha de defesa contra a seca.

O crescimento acentuado de raízes em direção às zonas úmidas do solo durante o estresse exige alocação de assimilados para as extremidades das raízes em crescimento. Durante o déficit hídrico, os assimilados são dirigidos para os frutos e distanciados das raízes (ver Capítulo 10), razão pela qual, a acentuada absorção de água resultante do crescimento das raízes é menos pronunciada nas plantas reprodutivas do que nas vegetativas. A competição por assimilados entre raízes e frutos explica porque as plantas são geralmente mais sensíveis ao estresse hídrico durante a reprodução.

FIGURA 25.2 As folhas de plantas jovens do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) sofrem abscisão em resposta ao estresse hídrico. As plantas à esquerda foram hidratadas durante todo o experimento; as do meio e à direita foram submetidas a estresse moderado e severo, respectivamente, antes de serem novamente hidratadas. Apenas um tufo de folhas é mantido nos topos dos caules das plantas severamente estressadas (cedida por B. L. McMichael).

Os estômatos fecham durante o déficit hídrico em resposta ao ácido abscísico

As seções anteriores enfocaram as mudanças no desenvolvimento vegetal durante desidratação lenta e a longo prazo. Quando o começo do estresse é mais rápido ou a planta alcançou sua área foliar plena antes de iniciar o estresse, outras respostas a protegem contra a desidratação imediata. Sob tais condições, o estômato fechado reduz a evaporação da área foliar. Assim, o fechamento estomático pode ser considerado uma terceira linha de defesa contra a seca.

A absorção e a perda de água nas células-guarda modificam seu turgor e modulam a abertura e o fechamento estomáticos (ver Capítulos 4 e 18). Por estarem localizadas na epiderme foliar, as células-guarda perdem turgor como resultado de uma perda direta de água para a atmosfera por evaporação. O decréscimo de turgor provoca **fechamento hidropassivo** dos estômatos. O mecanismo de fechamento provavelmente é acionado em ar de umidade baixa, quando a perda direta de água das células-guarda é demasiado rápida para ser equilibrada pelo movimento de água para dentro delas a partir de células epidérmicas adjacentes.

Um segundo mecanismo, o **fechamento hidroativo**, fecha os estômatos quando toda folha ou as raízes são desidratadas e depende de processos metabólicos nas células-guarda. Uma redução no conteúdo de solutos das células-guarda resulta em perda de água e diminuição de turgor, provocando fechamento estomático; assim, o mecanismo hidráulico do fechamento hidroativo é uma inversão do mecanismo de abertura estomática. Entretanto, o controle do fechamento hidroativo difere da abertura estomática de modo sutil, mas significativo.

A perda de solutos a partir das células-guarda pode ser desencadeada por um decréscimo no conteúdo de água da folha, e o ácido abscísico (ABA) (ver Capítulo 23) desempenha um papel importante nesse processo. O ácido abscísico é sintetizado continuamente em taxas baixas nas células do mesofilo e tende a se acumular nos cloroplastos. Quando o mesofilo torna-se moderadamente desidratado, acontece o seguinte:

1. Parte do ABA armazenado nos cloroplastos é liberada para o apoplasto (o espaço entre paredes celulares) do mesofilo (Hartung e cols., 1998). A redistribuição de ABA depende de gradientes de pH dentro da folha, de propriedades fracamente ácidas da molécula de ácido abscísico e das propriedades de permeabilidade de membranas celulares (Figura 25.3). A re-

Luz solar

1. A luz estimula a fotossíntese e o transporte ativo de H^+ para os grana, elevando o pH do estroma.

4. Uma vez que a membrana do cloroplasto é quase impermeável ao ABA^-, o ABA^- carregado é amplamente impermeável.

2. Em estroma alcalino, ABA•H se dissocia.

3. ABA•H difunde-se passivamente do citosol para o estroma.

H^+ · $H^+ + ABA^-$ · ABA·H · Grana · CLOROPLASTO · Estroma · ABA•H · $ABA^- + H^+$

FIGURA 25.3 Acumulação de ABA por cloroplastos na luz. A luz estimula a entrada de prótons nos grana, tornando o estroma mais alcalino. O aumento da alcalinidade causa a dissociação do ácido fraco ABA•H em H^+ e o ânion ABA^-. A concentração de ABA•H no estroma fica abaixo da concentração no citosol, diferença de concentração que aciona a difusão passiva de ABA•H através da membrana do cloroplasto. Ao mesmo tempo, a concentração de ABA^- no estroma aumenta, mas a membrana do cloroplasto é quase impermeável ao ânion (setas vermelhas), que, assim, permanece aprisionado. Esse processo continua até que as concentrações de ABA•H no estroma e no citosol sejam iguais. Mas desde que o estroma permaneça mais alcalino, a concentração total de ácido abscísico (ABA•H + ABA^-) no estroma ultrapassa em muito a concentração no citosol.

distribuição de ABA possibilita ao fluxo da transpiração transportar parte dele para as células-guarda.

2. O ABA é sintetizado em taxas mais altas e a maior quantidade dele se acumula no apoplasto foliar. As concentrações mais altas do ABA resultantes de taxas mais altas de sua síntese parecem acentuar ou prolongar o efeito inicial de fechamento por este ácido armazenado. O mecanismo de fechamento estomático induzida pelo ácido abscísico é discutido no Capítulo 23.

As respostas estomáticas à desidratação foliar podem apresentar ampla variação, intra e interespecífica. Os estômatos de algumas espécies com desidratação retardada, como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) e a mandioca (*Manihot esculenta*) são incomumente responsáveis pelo decréscimo na disponibilidade de água; a condutância estomática e a transpiração decrescem tanto que o potencial hídrico da folha (Ψ_w; ver Capítulos 3 e 4) pode permanecer quase constante durante a seca.

Sinais químicos das raízes podem afetar as respostas estomáticas ao estresse hídrico (Davies e cols., 2002). A condutância estomática freqüentemente está muito mais intimamente relacionada com o *status* hídrico do solo do que com o *status* hídrico da folha. A única parte da planta que pode ser diretamente afetada pelo *status* hídrico do solo é o sistema subterrâneo. De fato, a desidratação de apenas parte das raízes pode causar fechamento estomático, mesmo que uma porção bem hidratada do sistema subterrâneo ainda libere grande quantidade de água para a parte aérea.

Quando indivíduos de milho (*Zea mays*) crescem com as raízes orientadas em dois vasos separados e um dos vasos não foi suprido de água, os estômatos fecham parcialmente e o potencial hídrico da folha aumenta, justamente como nos casos de retardo da desidratação descritos. Tais resultados mostram que os estômatos podem responder às condições percebidas nas raízes. Além do ABA (Sauter e cols., 2001), outros sinais, como o pH e a redistribuição iônica inorgânica, parecem desempenhar um papel na sinalização de longa distância entre as raízes e as partes aéreas (Davies e cols., 2002).

O déficit hídrico limita a fotossíntese dentro do cloroplasto

A taxa fotossintética da folha (expressa por unidade de área foliar) raramente é tão responsiva ao estresse hídrico moderado quanto a expansão foliar (Figura 25.4), pois a fotossíntese é muito menos sensível ao turgor do que a expansão foliar. Entretanto, estresse hídrico moderado afeta, geralmente, a fotossíntese foliar e a condutância estomática. Como os estômatos fecham durante os estádios iniciais do estresse hídrico, a eficiência do uso da água (ver Capítulos 4 e 9) pode aumentar (ou seja, mais CO_2 pode ser absorvido por unidade de água transpirada), porque o fechamento estomático inibe a transpiração mais do que diminui as concentrações intercelulares de CO_2.

Como o estresse torna-se severo, no entanto, a desidratação de células do mesofilo inibe a fotossíntese, o metabolismo do mesofilo é prejudicado e a eficiência do uso da água decresce. Os resultados de muitos estudos têm mostrado que o efeito relativo do estresse hídrico sobre a condutância estomática é significantemente maior do que sobre a fotossíntese. A resposta da fotossíntese e da condutância estomática ao estresse hídrico pode ser separada pela exposição de folhas estressadas ao ar contendo concentrações altas de CO_2. Todo o efeito do estresse sobre a condutância estomática é eliminado pelo suprimento alto de CO_2 e diferenças entre taxas fotossintéticas de plantas estressadas e não-estressadas podem ser atribuídas diretamente ao dano do estresse hídrico à fotossíntese.

O estresse hídrico afeta diretamente a translocação? O estresse hídrico reduz tanto a fotossíntese quanto o consumo de assimilados nas folhas em expansão. Como conseqüência, o estresse hídrico diminui indiretamente a quantidade de fotossintatos exportados das folhas. Uma vez que o transporte do floema depende do turgor (ver Capítulo 10), a redução do potencial hídrico no floema durante o estresse pode inibir o movimento de assimilados. Todavia, experimentos têm mostrado que a translocação não é afetada durante o período de estresse, quando outros processos, como a fotossíntese, já foram fortemente inibidos (Figura 25.5).

Essa intensidade relativa de translocação quanto ao estresse permite às plantas mobilizar e utilizar reservas onde elas são necessárias (p. ex., no crescimento das sementes), mesmo quando ele é extremamente severo. A capacidade de continuar translocando assimilados é um fator-chave em quase todos os aspectos da resistência vegetal à seca.

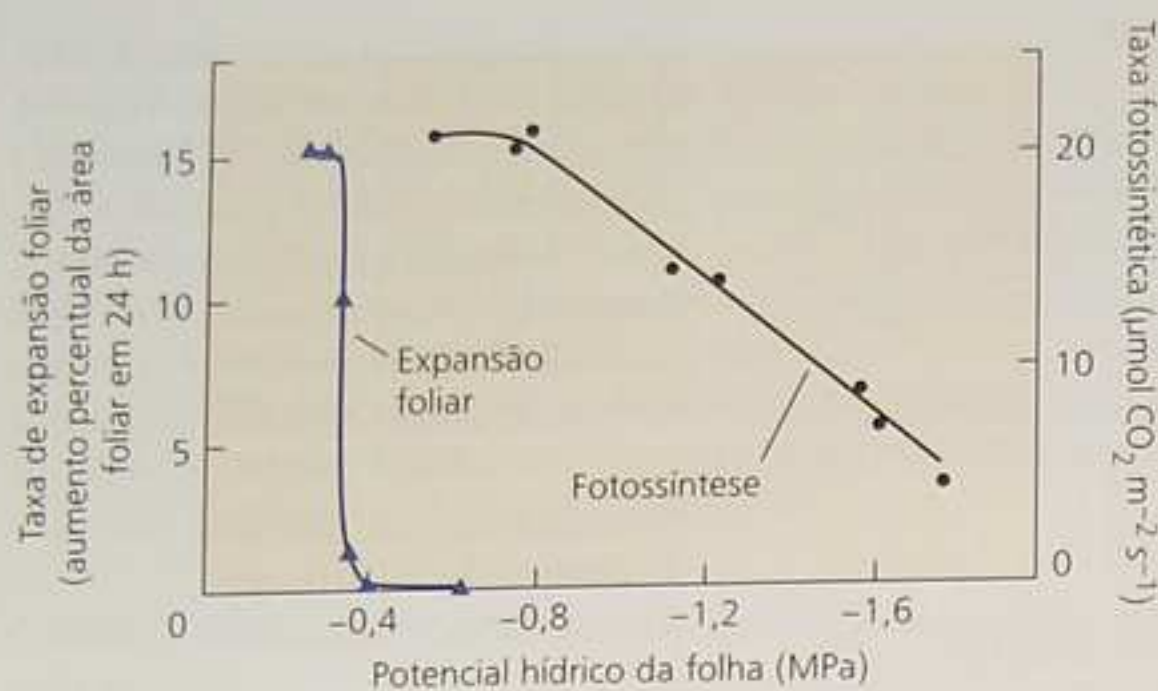



FIGURA 25.4 Efeitos do estresse hídrico sobre a fotossíntese e a expansão foliar do girassol (*Helianthus annuus*). Essa espécie representa muitas plantas nas quais a expansão foliar é muito sensível ao estresse hídrico; ela é completamente inibida sob níveis moderados de estresse, que afetam severamente as taxas fotossintéticas (Boyer, 1970).

O ajuste osmótico de células auxilia a manter o balanço hídrico da planta

Quando o solo seca, seu potencial mátrico (ver **Tópico 3.3 na Internet**) torna-se mais negativo. As plantas continuam a absorver água enquanto seu potencial hídrico (Ψ_w) for menor (mais negativo) do que o da água do solo. O ajuste osmótico, ou acumulação de solutos pelas células, é um processo pelo qual o potencial hídrico pode ser diminuído sem que haja decréscimo do turgor ou do volume celular. Lembrar da Equação 3.6 do Capítulo 3: $\Psi_w = \Psi_s + \Psi_p$. A mudança no potencial hídrico da célula resulta simplesmente de mudanças no potencial do soluto (Ψ_s), o componente osmótico de Ψ_w.

O **ajuste osmótico** é um aumento líquido no conteúdo de soluto por célula e independe das mudanças de volume resultantes da perda de água. O decréscimo em Ψ_s é tipicamente limitado a mais ou menos 0,2 a 0,8 MPa, exceto em plantas adaptadas a condições extremamente secas. A maior parte do ajuste em geral pode ser calculada pelos aumentos da concentração de uma variedade de solutos comuns, incluindo açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e íons inorgânicos (especialmente K^+).

As enzimas citosólicas de células vegetais podem ser severamente inibidas por concentrações altas de íons. A acumulação de íons durante o ajuste osmótico parece estar restrita aos vacúolos, onde os íons são impedidos de entrar em contato com enzimas no citosol ou organelas subcelulares. Por causa dessa compartimentação de íons, outros solutos devem se acumular no citoplasma, a fim de manter o equilíbrio do potencial hídrico dentro da célula.

Esses outros solutos, chamados de **solutos compatíveis** (ou osmólitos compatíveis), são compostos orgânicos que não interferem nas funções das enzimas. Os solutos compatíveis comumente acumulados compreendem o aminoácido prolina, alcoóis de açúcar (p. ex., sorbitol e manitol), além de uma amina quaternária — a glicina betaína. A síntese de solutos compatíveis auxilia no ajuste de plantas ao aumento de salinidade na zona das raízes, conforme será discutido mais adiante.

O ajuste osmótico desenvolve-se lentamente em resposta à desidratação do tecido. No decorrer de vários dias, ocorrem também outras mudanças, como crescimento ou fotossíntese. Assim, pode ser questionado que o ajuste osmótico não é uma resposta independente e direta ao déficit hídrico, mas os resultado de outro fator, como a diminuição da taxa de crescimento. Todavia, as folhas que são capazes de ajuste osmótico podem claramente manter o turgor sob potenciais hídricos mais baixos do que as folhas sem tal capacidade. A manutenção do turgor possibilita a continuação do alongamento celular e facilita condutâncias estomáticas mais altas sob potenciais hídricos mais baixos, sugerindo que o ajuste osmótico é uma aclimatação que aumenta a tolerância à desidratação.

Quanto de água extra pode ser obtido pela planta por causa do ajuste osmótico nas células foliares? A maior parte da água passível de extração do solo fica presa em espaços (preenchidos com água e ar), a partir dos quais ela é prontamente removida pelas raízes (ver Capítulo 4). Com a seca do solo, esta água é utilizada primeiro, permanecendo uma pequena quantidade de água retida mais firmemente em pequenos poros.

O ajuste osmótico possibilita que a planta extraia mais dessa água firmemente retida, mas o aumento da água total disponível é pequeno. Assim, o custo do ajuste osmótico na folha é compensado pelos benefícios rapidamente decrescentes em termos de disponibilidade de água para a planta, conforme pode ser visto pela comparação das relações hídricas de espécies com e sem ajuste (Figura 25.6). Tais resultados mostram que o ajuste osmótico promove a tolerância à desidratação, mas não tem um efeito maior sobre a produtividade (McCree e Richardson, 1987).

O ajuste osmótico também ocorre em raízes, embora o processo nesses órgãos não tenha sido estudado tão extensivamente como em folhas. A magnitude absoluta do ajuste é menor em raízes do que em folhas, mas, como uma percentagem do potencial original de soluto do tecido (Ψ_s), ela pode ser maior em raízes do que em folhas. Como acontece com as folhas, essas mudanças, em muitos casos, podem aumentar apenas levemente a extração de água do solo anteriormente explorado. No entanto, o ajuste osmótico pode ocorrer nos meristemas das raízes, aumentando o turgor e mantendo o crescimento delas. Trata-se de um componente im-

FIGURA 25.5 Efeitos relativos do estresse hídrico sobre a fotossíntese e translocação, no sorgo (*Sorghum bicolor*). As plantas foram expostas ao ^{14}C por um intervalo de tempo curto. A radioatividade fixada na folha foi tomada como medida de fotossíntese e a perda de radioatividade após remoção da fonte de $^{14}CO_2$ foi tomada como medida da taxa de translocação de assimilados. A fotossíntese foi afetada pelo estresse moderado e a translocação não foi afetada, decaindo só mais tarde com o aumento do estresse (Sung e Krieg, 1979).

FIGURA 25.6 Perda de água e ganho de carbono pela beterraba (*Beta vulgaris*), uma espécie com ajuste osmótico, e feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), uma espécie sem ajuste que economiza água durante o estresse, pelo fechamento estomático. As plantas cresceram em vasos e foram submetidas a estresse hídrico. Todos os dias após a última rega, as folhas de beterraba mantiveram um potencial hídrico mais baixo do que as folhas de feijão-de-corda, mas a fotossíntese e a transpiração durante o estresse foram apenas levemente maiores na beterraba. A diferença maior entre as duas espécies foi quanto ao potencial hídrico foliar. Tais resultados mostram que o ajuste osmótico promove a tolerância à desidratação, mas não tem um efeito maior sobre a produtividade (McCree e Richardson, 1987).

portante das mudanças nos padrões de crescimento das raízes, quando a água é esgotada do solo.

O ajuste osmótico aumenta a produtividade vegetal? Pesquisadores têm manipulado a acumulação de solutos osmoprotetores pelo reprodução convencional de plantas, por métodos fisiológicos (induzindo o ajuste com déficits hídricos controlados) e pelo uso de plantas transgênicas expressando genes para síntese e acumulação de solutos. Contudo, as plantas modificadas crescem mais lentamente e elas são apenas levemente mais tolerantes a estresses osmóticos. Assim, o emprego do ajuste osmótico para melhorar o desempenho agrícola precisa ainda ser aperfeiçoado.

O déficit hídrico aumenta a resistência ao fluxo de água na fase líquida

Quando o solo seca, sua resistência ao fluxo de água aumenta muito bruscamente, em particular próximo ao *ponto de murcha permanente*. Lembrar do Capítulo 4, em que, no ponto de murcha permanente (em geral cerca de –1,5 MPa), as plantas não podem readquirir a pressão de turgor, mesmo se toda a transpiração parasse (para mais detalhes sobre a relação entre condutividade hidráulica do solo e potencial hídrico do solo, ver **Figura 4.2.A no Tópico 4.2 na Internet**). Por ser muito grande a resistência do solo ao fluxo da água, a liberação dessa para as raízes no ponto de murcha permanente é demasiado lenta para permitir a re-hidratação noturna de plantas que murcharam durante o dia.

A re-hidratação é mais tarde impedida pela resistência dentro da planta, que é muito maior que a aquela dentro do solo (Blizzard e Boyer, 1980). Vários fatores podem contribuir para o aumento da resistência da planta ao fluxo hídrico durante o dessecamento. Ao secarem, as células vegetais encolhem. Quando as raízes encolhem, a sua superfície pode se afastar das partículas do solo que retêm a água e é possível que os delicados pêlos radiculares sejam danificados. Além disso, como as raízes expandem-se lentamente durante o dessecamento, a camada externa do seu córtex (a exoderme) muitas vezes torna-se extensivamente coberta por suberina, uma lipídeo impermeável à água (ver Figura 4.4), aumentando a resistência ao fluxo hídrico.

Um outro importante fator que aumenta a resistência ao fluxo hídrico é a *cavitação*, ou seja, o rompimento da coluna líquida sob tensão no xilema. Como foi visto no Capítulo 4, a transpiração das folhas "puxa" água pela planta, criando uma tensão na coluna de água. As forças de coesão, necessárias para suportar grandes tensões, estão presentes apenas em colunas muito estreitas, nas quais a água adere às paredes.

A cavitação começa na maioria das plantas sob potenciais hídricos moderados (–1 a –2 MPa) e os vasos maiores cavitam primeiro. Em árvores como o carvalho (*Quercus*), por exemplo, os vasos de maior diâmetro, que se formam na primavera, funcionam como um trajeto de pouca resistência no começo da estação de crescimento, quando há ampla disponibilidade de água. Como o solo seca durante o verão, esses vasos grandes param de funcionar, fazendo com que os de diâmetro menor, produzidos durante o período de estresse, assumam a corrente da transpiração. Essa substituição tem conseqüências de longa duração: mesmo que a água torne-se disponível, o trajeto original de pouca resistência permanece não-funcional, reduzindo a eficiência do fluxo hídrico.

O déficit hídrico aumenta o depósito de cera sobre a superfície foliar

Uma resposta evolutiva comum ao estresse hídrico é a produção de uma cutícula espessa, que reduz a perda de água pela epiderme (transpiração cuticular). Embora as ceras sejam depositadas em resposta ao déficit hídrico, tanto sobre a superfície quanto na camada interna da cutícula, essa camada pode ser mais importante no controle da taxa de perda de água em processos que são mais complexos do que pelo simples aumento na quantidade de cera (Jenks e cols., no prelo).

Uma cutícula espessa também reduz a permeabilidade ao CO_2, mas a fotossíntese foliar permanece inafetada, pois as células epidérmicas não são fotossintéticas. A transpiração cuticular, contudo, representa apenas 5 a 10% da transpiração foliar total, de modo

que ela torna-se significante apenas se o estresse for extremamente severo ou se a cutícula for danificada (p. ex., por areia carregada pelo vento).

O déficit hídrico altera a dissipação de energia das folhas

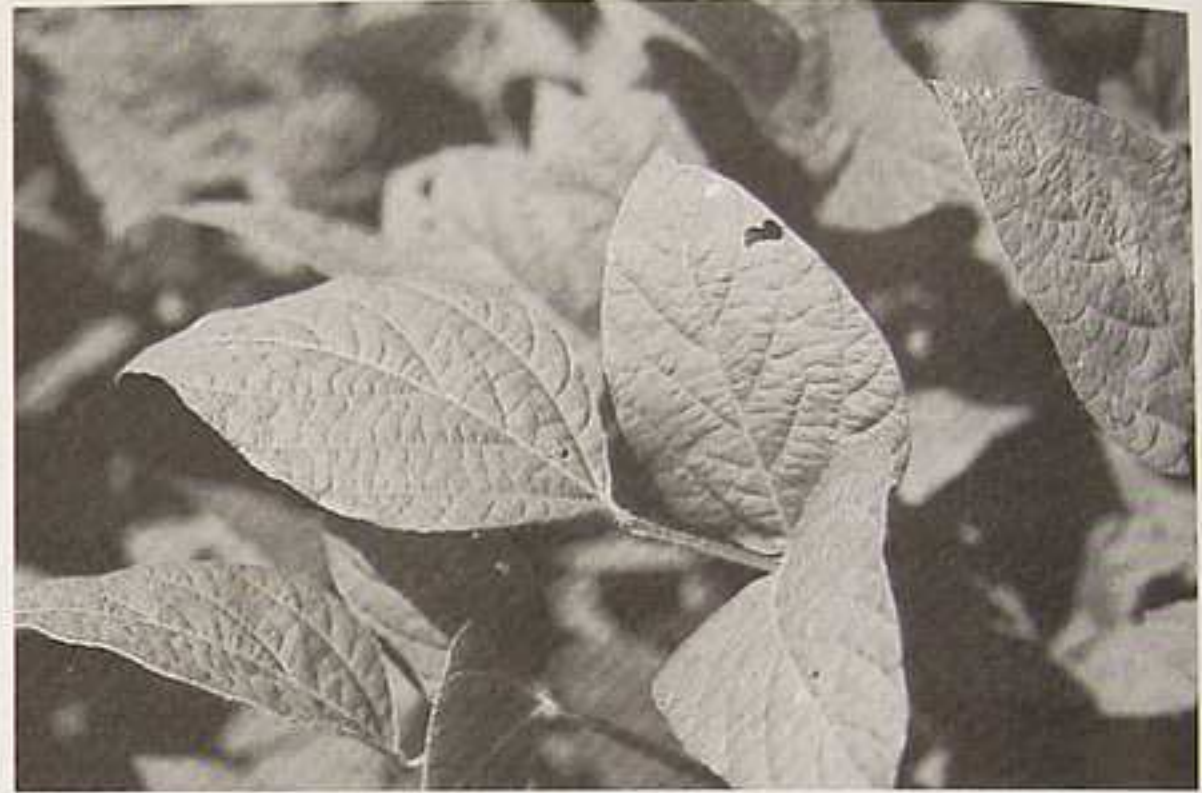
No Capítulo 9, viu-se que a perda de calor por evaporação diminui a temperatura foliar. Este efeito de esfriamento pode ser extraordinário: no Vale da Morte, Califórnia — um dos lugares mais quentes do mundo —, as temperaturas de plantas com acesso a um amplo suprimento hídrico chegam a 8°C abaixo da temperatura do ar. Em climas quentes e secos, um agricultor experiente pode concluir se as plantas necessitam de água, simplesmente tocando nas folhas, pois uma folha que transpira com rapidez torna-se nitidamente fria. Quando o estresse hídrico limita a transpiração, a folha esquenta, a não ser que outro processo compense a falta de esfriamento. Por causa desses efeitos da transpiração sobre a temperatura foliar, tanto o estresse hídrico quanto o térmico estão intimamente relacionados (ver a discussão sobre estresse térmico adiante neste capítulo).

A manutenção da temperatura foliar muito abaixo da temperatura do ar exige a evaporação de grandes quantidades de água. Por isso, as adaptações que esfriam as folhas por outros meios além da evaporação (p. ex., mudanças no tamanho e na orientação da folha) são muito efetivas na conservação da água. Quando a transpiração diminui e a temperatura foliar torna-se mais alta do que a do ar, parte da energia extra na folha é dissipada como perda de calor sensível (ver Capítulo 9). Muitas plantas de zonas áridas têm folhas muito pequenas, que minimizam a resistência da camada limítrofe à transferência de calor da folha para o ar (ver Figura 9.14).

Devido à baixa resistência da sua camada limítrofe, a temperatura das folhas pequenas tende a permanecer próximo à do ar, mesmo quando a transpiração é bastante lenta. As folhas grandes, ao contrário, têm resistência mais alta da camada limítrofe e dissipam menos energia térmica (por unidade de área), por transferência direta de calor para o ar.

Em folhas maiores, o movimento foliar pode fornecer proteção adicional contra o aquecimento durante o estresse hídrico. As folhas que se orientam em direção oposta à do sol são denominadas *para-heliotrópicas*; as folhas que recebem energia por terem orientação normal (perpendicular) à luz solar são chamadas de *dia-heliotrópicas* (ver Capítulo 9). A Figura 25.7 mostra o forte efeito da estresse hídrico sobre a posição das folhas da soja. Outros fatores que podem alterar a intercepção da radiação são a murcha, que altera o ângulo da folha, e o enrolamento foliar em gramíneas, que minimiza a superfície exposta ao sol.

A absorção de energia pode também ser reduzida por tricomas na superfície foliar ou por camadas de cera refletora epicuticular. As folhas de algumas plantas têm uma aparência cinza-esbranquiçada porque os tricomas dispostos densamente refletem uma quantidade grande de luz. Ao refletir a radiação, a pilosidade, ou **pubescência**, mantém as folhas mais frias, mas ela reflete junto os comprimentos de onda visíveis que são ativos na fotossíntese e, com isso, há um decréscimo na assimilação de carbono, razão pela qual, têm sido malsucedidas as tentativas de provocar a pubescência em culturas, para melhorar sua eficiência no uso da água.

(A) Bem hidratada

(B) Estresse hídrico moderado

(C) Estresse hídrico severo

FIGURA 25.7 Orientação de folíolos de indivíduos de soja (*Glycine max*) crescendo no campo, em posição normal, não-estressada (A), durante estresse hídrico moderado (B) e durante estresse hídrico severo (C). Os movimentos foliares amplos induzidos por estresse moderado são completamente diferentes da murcha, que ocorre durante o estresse severo. Observe que durante o estresse moderado (B) o folíolo terminal fica levantado, enquanto os laterais orientam-se para baixo; o todo é quase vertical (cedidas por D. M. Oosterhuis).

O estresse osmótico induz o metabolismo ácido das crassuláceas em algumas plantas

O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) é uma adaptação vegetal, no qual os estômatos abrem à noite e fecham durante o dia (ver Capítulos 8 e 9). A diferença de vapor de pressão da folha em relação ao ar, que aciona a transpiração, é bastante reduzida à noite, quando ambos apresentam temperatura mais baixa. Como conseqüência, as plantas CAM exibem as mais altas eficiências no uso da água. Uma planta CAM pode obter 1 g de matéria seca por apenas 125 g de água usada — uma razão três a cinco vezes maior do que a de uma planta C_3 típica (ver Capítulo 4).

O metabolismo ácido das crassuláceas prevalece em plantas suculentas, como os cactos. Algumas espécies suculentas exibem tal fenômeno facultativamente, tornando-se CAM quando submetidas a déficits hídricos ou a condições salinas (ver Capítulo 8). Esta mudança no metabolismo é uma notável adaptação ao estresse, envolvendo a acumulação das enzimas fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase (Figura 25.8), piruvato-ortofosfato diquinase e a enzima NADP-málica, entre outras.

Conforme tratado nos Capítulos 8 e 9, o metabolismo ácido das crassuláceas envolve muitas características estruturais, fisiológicas e bioquímicas, incluindo mudanças nos padrões de carboxilação e descarboxilação, transporte de grandes quantidades de malato para dentro e para fora dos vacúolos e a inversão da periodicidade de movimentos estomáticos. Assim, a indução ao CAM é uma notável adaptação ao déficit hídrico, que ocorre em muitos níveis de organização.

O estresse osmótico altera a expressão gênica

A acumulação de solutos compatíveis, em resposta ao estresse osmótico, exige a ativação das rotas metabólicas que sintetizam tais solutos. Vários genes que codificam enzimas associadas ao ajuste osmótico são favorecidos (super regulados) por estresse osmótico e/ou salinidade e estresse pelo frio. Tais genes codificam enzimas, como as apresentadas a seguir (Buchanan e cols., 2000):

- Δ'^1-Pirrolina-5-carboxilato sintase, uma enzima-chave na rota biossintética de prolina
- Betaína aldeído desidrogenase, uma enzima envolvida na acumulação de glicina betaína
- *mio*-Inositol 6-O-metiltransferase, uma enzima limitante de taxa na acumulação do pinitol, um álcool de açúcar cíclico.

Vários outros genes que codificam enzimas bem-conhecidas são induzidos por estresse osmótico. A expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase aumenta durante o estresse osmótico, talvez para permitir um aumento do fluxo de carbono em solutos orgânicos para o ajuste osmótico. As enzimas envolvidas na síntese de lignina também são controladas por estresse osmótico.

A redução nas atividades de enzimas-chave também ocorre. A acumulação do álcool de açúcar manitol em resposta ao estresse osmótico parece não ser ocasionada pela super-regulação de genes produtores de enzimas envolvidas na síntese de manitol, mas, sim, pela sub-regulação de genes associados à produção de sacarose e degradação de manitol. Assim, a acumulação de manitol é acentuada durante episódios de estresse osmótico.

Outros genes regulados por estresse osmótico codificam proteínas associadas ao transporte de membrana, incluindo APTases (Niu e cols., 1995) e as proteínas de canal de água, *aquaporinas* (ver Capítulo 3) (Maggio e Joly, 1995). Vários genes de proteases são também induzidos por estresse e essas enzimas podem degradar (remover e reciclar) outras proteínas desnaturadas por episódios de estresse. A proteína *ubiquitina* marca proteínas que são alvo da degradação proteolítica. A síntese de mRNA por ubiquitina aumenta em *Arabidopsis* sob estresse por desidratação. Além do mais, algumas *proteínas de choque térmico* são osmoticamente induzidas e podem proteger ou renaturar proteínas inativadas por desidratação.

Dias após o estresse salino

1 2 3 4 5 6

Aumento da proteína PEP carboxilase

FIGURA 25.8 Aumentos do conteúdo de fosfoenolpiruvato (PEP) carboxilase na planta-de-gelo (*Mesembryanthemum crystallinum*) durante a passagem do metabolismo C_3 para CAM, induzida por sal. O estresse hídrico foi induzido pela adição de 500 mM de NaCl à água da irrigação. A proteína PEP carboxilase foi revelada em gel, com uso de anticorpos e de um corante (Bohnert e cols., 1989).

A sensibilidade da expansão celular ao estresse osmótico (ver Figura 25.1) tem estimulado estudos de vários genes que codificam proteínas envolvidas na composição estrutural e integridade de paredes celulares. Tem sido constatado que genes codificadores de enzimas como S-adenosilmetionina sintase e peroxidases, que podem estar envolvidas na síntese da lignina, são controlados por estresse.

Um grande grupo de genes regulados por estresse osmótico foi descoberto pelo exame de embriões que se desidratam naturalmente durante a maturação da semente. Esses genes codificam as assim chamadas **proteínas LEA** (do inglês, *l*ate *e*mbryogenesis *a*bundant) e suspeita-se que eles desempenhem um papel na proteção da membrana celular. Embora a função das proteínas LEA não seja bem compreendida (Tabela 25.2), elas se acumulam em tecidos vegetativos durante episódios de estresse osmótico. As proteínas codificadas por esses genes são tipicamente hidrofílicas e ligam-se fortemente à água. Seu papel protetor pode estar associado à capacidade de reter água e de evitar, durante a desidratação, a cristalização de importantes proteínas e outras moléculas. Elas podem também contribuir para a estabilização de membranas.

Mais recentemente, têm sido utilizadas técnicas de micrordenação para examinar os genomas de algumas plantas, em resposta ao estresse. Tais estudos têm revelado que numerosos genes exibem mudanças na expressão, após as plantas terem sido expostas ao estresse. Os genes controlados por estresse refletem acima de 10% do número total de genes do arroz examinado (Kawasaki e cols., 2001).

O estresse osmótico leva tipicamente à acumulação de ABA (ver Capítulo 23). Desse modo, não é surpresa que produtos de genes ABA-responsivos acumulem-se durante o estresse osmótico. Estudos com mutantes ABA-insensíveis e ABA-deficientes têm mostrado que numerosos genes induzidos por estresse osmótico sofrem, de fato, indução pelo ABA acumulado durante o episódio de estresse. No entanto, nem todos os genes regulados por estresses osmóticos são regulados pelo ABA. Conforme será discutido na próxima seção, têm sido descobertos outros mecanismos de re-

TABELA 25.2
Os cinco grupos de proteínas vegetais abundantes na embriogênese tardia (LEA)

Grupo (nome da família)[a]	Proteína(s) no grupo	Características estruturais e motivos	Informação funcional/função proposta
Grupo 1 (família D-19)	Algodão D-19 Trigo Em (proteína antigamente classificada com metionina) Girassol Ha ds 10 Cevada B19	Conformação é predominantemente em espiral aleatória, com algumas hélices α curtas preditas Aminoácidos e glicina carregados são abundantes	Contém mais água de hidratação do que proteínas globulares típicas Superexpressão confere tolerância ao déficit hídrico às células de levedura
Grupo 2 (família D-1) (também identificado como das deidrinas)	Milho DHN1, M3, RAB17 Algodão D-11 *Arabidospsis* pRABAT1, ERD10, ERD14 *Craterostigma* pcC 27-04, pcC 6-19 Tomateiro pLEA, TAS14 Cevada B8, B9, B17 Arroz pRAB16A Cenoura pcEP40	Estrutura variável inclui regiões ricas em lisine formadoras de hélice α A seqüência consenso para o grupo 2 de deidrinas é EKKGIMDKIKELPG O número de vezes que esse consenso repete-se por proteína varia Freqüentemente contém uma região poli(serina) Freqüentemente contém regiões de comprimento variável, ricas em resíduos polares e Gly ou Ala, e Pro	Freqüentemente localizado junto ao citoplasma ou núcleo Membros mais ácidos da família estão associados à membrana plasmática Pode atuar na estabilização de macromoléculas sob baixo potencial hídrico
Grupo 3 (família D-7)	Cevada HVA1 (induzida pelo ABA) Algodoeiro D-7 Trigo pMA2005, pMA1949 *Craterostigma* pcC3-06	Uma seqüência consenso de 11 aminoácidos, motivo TAQAAKEKAXE, é repetida na proteína Contém hélices α aparentemente anfipáticas Proteína dimérica	Plantas transgênicas expressando HVA1 demonstram acentuada tolerância ao déficit hídrico D-7 é uma proteína abundante em embriões de algodão (concentração estimada de 0,25 *mM*) Cada dímero putativo de D-7 pode até 10 fosfatos inorgânicos e seus contra-íons
Grupo 4 (família D-95)	Soja D-95 *Craterostigma* pcC27-45	Levemente hidrofóbica Região N-terminal é predita para formar hélices α-anfipáticas	No tomateiro, um gene que codifica uma proteína similar é expresso em resposta ao ataque de nematóide
Grupo 5 (família D-113)	Tomateiro LE25 Girassol Hads11 Algodoeiro D-113	Membros da família compartilham homologia da seqüência na extremidade N conservada Região N-terminal é predita formar hélices α Domínio C-terminal é predito ser uma espiral aleatória de comprimento e seqüência variáveis Ala, Gly e Thr são abundantes na seqüência	Liga-se a membranas e/ou proteínas para manter a estrutura durante o estresse Possivelmente funciona no seqüestro de íons para proteger o metabolismo do citosol Quando LE25 está expresso em levedura, ele confere tolerância ao sal e à congelação D-113 é abundante em sementes de algodão (acima de 0,3 *mM*)

[a]Os nomes das famílias derivam das proteínas da semente do algodoeiro que são mais similares à família.
Fonte: Bray e cols., 2000.

gulação da expressão gênica de genes regulados por estresse osmótico.

Os genes responsivos ao estresse são regulados por processos ABA-dependentes e ABA-independentes

A transcrição gênica é controlada pela interação de proteínas reguladoras (fatores de transcrição) com seqüências reguladoras específicas nos promotores dos genes que elas regulam (o **Capítulo 14 na Internet** discute estes processos em detalhe). Genes diferentes, induzidos pelo mesmo sinal (p. ex., desidratação ou salinidade), são controlados por uma rota de sinalização que leva à ativação desses fatores de transcrição específicos.

Estudos dos promotores de vários genes induzidos por estresse têm levado à identificação de seqüências de regulação específicas para genes envolvidos em estresses distintos. O gene *RD29*,

por exemplo, contém seqüências de DNA que podem ser ativadas por estresse osmótico, pelo frio ou por ABA (Yamaguchi-Shinozaki e Shinozaki, 1994; Stockinger e cols., 1997).

Os promotores de genes regulados pelo ABA contêm um elemento de seqüência de seis nucleotídeos, referido como **elemento de resposta ao ABA** (ABRE; do inglês, ABA *response element*), que provavelmente liga fatores de transcrição envolvidos na ativação gênica regulada pelo ABA (ver Capítulo 23). Os promotores desses genes, que são regulados por estresse osmótico de uma maneira ABA-dependente, contêm um elemento alternativo de seqüência de regulação de nove nucleotídeos, o **elemento de resposta à desidratação** (DRE; do inglês, *dehydration response element*), reconhecido por um conjunto alternativo de proteínas que regulam a transcrição. Assim, os genes regulados por estresses osmóticos parecem ser regulados por rotas de transdução de sinais mediadas pela ação do ABA **(genes ABA-dependentes)** ou por uma rota de transdução de sinal, **ABA-independente**, responsiva ao estresses osmótico.

Pelo menos duas rotas de sinalização têm sido implicadas na regulação da expressão gênica em uma maneira ABA-independente (Figura 25.9). *Fatores de transcrição* transacionantes (denominados DREB1 e DREB2), que se ligam aos elementos DRE nos promotores de genes responsivos ao estresse osmótico, são aparentemente ativados por uma cascata de sinalização ABA-independente. Outros genes ABA-independentes, responsivos ao estresse osmótico, parecem ser controlados diretamente pela assim chamada cascata de sinalização MAP quinase de proteínas quinases (discutida em detalhe no Capítulo 14 na Internet). Outras mudanças na expressão gênica parecem ser mediadas por outros mecanismos, não envolvendo DREBs.

Esta complexidade e "conversa cruzada" (do inglês, *cross-talk*) encontradas em cascatas de sinalização, exemplificadas aqui pelas rotas ABA-dependente e ABA-independente, são típicas da sinalização eucariótica. Tal complexidade reflete a riqueza da interação entre expressão gênica e os processos fisiológicos mediadores da adaptação ao estresse osmótico.

FIGURA 25.9 Rotas de transdução de sinais do estresse osmótico em células vegetais. O estresse osmótico é percebido por um receptor ainda desconhecido na membrana plasmática, ativando as rotas de transdução de sinais ABA-independente e ABA-dependente. A síntese de proteínas participa em uma das rotas ABA-dependente, envolvendo MYC/MYB. A rota bZIP ABA-dependente envolve o reconhecimento de elementos ABA-responsivos em promotores de genes. Duas rotas ABA-independentes, uma envolvendo a cascata de sinalização MAP quinase e a outra envolvendo fatores de transcrição relacionados a DREBP/CBF, têm sido também demonstradas (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

ESTRESSE E CHOQUE TÉRMICOS

A maior parte dos tecidos de plantas superiores é incapaz de sobreviver a uma prolongada exposição a temperaturas acima de 45°C. Células que não estão em crescimento ou tecidos desidratados (p. ex., sementes e pólen) podem sobreviver a temperaturas muito mais altas do que células hidratadas, vegetativas e em crescimento (Tabela 25.3). Tecidos crescendo de modo ativo raramente sobrevivem a temperaturas acima de 45°C, mas sementes secas e grãos de pólen de algumas espécies podem suportar 120°C e 70°C, respectivamente. Em geral, apenas os eucariontes unicelulares podem completar seu ciclo de vida sob temperaturas maiores que 50°C e somente os procariontes podem se dividir e crescer acima de 60°C.

Exposição breve e periódica a estresses térmicos subletais freqüentemente induz tolerância a temperaturas letais, um fenômeno que recebe a denominação de **termotolerância induzida.** Os mecanismos que fazem a mediação da termotolerância induzida serão discutidos mais tarde neste capítulo. Como já foi mencionado, os estresses hídrico e térmico estão relacionados; as partes aéreas da maioria das plantas C_3 e C_4, com acesso a abundante suprimento hídrico, são mantidos abaixo de 45°C por esfriamento evaporativo; se a água tornar-se limitante, o esfriamento evaporativo decresce e as temperaturas dos tecidos aumentam. Plântulas emergentes em solo úmido podem constituir uma exceção a esta regra geral. Tais plântulas podem ser expostas a um estresse térmico maior do que aquelas em solos mais secos, porque o solo úmido e descoberto é tipicamente mais escuro e absorve mais radiação solar do que o solo mais seco.

A temperatura foliar alta e o déficit hídrico levam ao estresse térmico

Muitas plantas superiores CAM, suculentas, como *Opuntia* e *Sempervivum*, estão adaptadas a temperaturas altas. Elas podem tolerar temperaturas internas de 60 a 65°C, sob condições de radiação solar intensa no verão (ver Tabela 25.3). Por manterem seus estômatos fechados durante o dia, as plantas CAM não podem diminuir a sua temperatura pela transpiração. Em vez disso, elas dissipam o calor da radiação solar incidente por reemissão de radiação de onda longa (infravermelho) e perda de calor por condução e convecção (ver Capítulo 9).

Por outro lado, plantas C_3 e C_4 típicas, não-irrigadas, contam com o esfriamento pela transpiração para reduzir sua temperatura foliar. Nessas plantas, a temperatura foliar pode rapidamente subir 4 a 5°C acima da temperatura ambiente, sob luz solar plena

próximo ao meio-dia, quando o déficit de água no solo provoca fechamento estomático parcial ou quando a umidade relativa alta reduz o potencial de esfriamento evaporativo. As conseqüências fisiológicas desses aumentos na temperatura interna serão discutidas na próxima seção.

Os aumentos da temperatura foliar durante o dia podem ser pronunciados em plantas de regiões áridas e semi-áridas submetidas à seca e à alta irradiância da luz solar. O estresse térmico é também um perigo potencial em casas de vegetação, onde a baixa velocidade do ar e a alta umidade reduzem a taxa de esfriamento foliar. Um grau moderado de estresse térmico retarda o crescimento de toda a planta. Alguns cultivos irrigados, como o algodoeiro, utilizam o esfriamento pela transpiração para dissipar o calor. No algodoeiro irrigado, o acentuado esfriamento pela transpiração está associado a produtividades agronômicas maiores (ver **Tópico 25.1na Internet**).

Sob temperaturas altas, a fotossíntese é inibida antes da respiração

A fotossíntese e a respiração são inibidas sob temperaturas altas, mas com o aumento da temperatura as taxas fotossintéticas caem antes das taxas respiratórias (Figura 25.10A e B). A temperatura na qual a quantidade de CO_2 fixado pela fotossíntese iguala-se à quantidade de CO_2 liberado por respiração, em um determinado intervalo de tempo, é denominada **ponto de compensação da temperatura.**

Sob temperaturas acima do ponto de compensação da temperatura, a fotossíntese não pode repor o carbono usado como substrato para a respiração. Como conseqüência, as reservas de carboidratos diminuem e os frutos e verduras perdem açúcares. Tal desequilíbrio entre fotossíntese e respiração é uma das principais razões do efeito deletério de temperaturas altas.

TABELA 25.3
Temperaturas letais para plantas

Planta	Temperatura letal (°C)	Tempo de exposição
Nicotiana rustica (tabaco selvagem)	40-51	10 minutos
Cucurbita pepo (abóbora)	49-51	10 minutos
Zea mays (milho)	49-51	10 minutos
Brassica napus (colza)	49-51	10 minutos
Citrus aurantium (laranja azeda)	50,5	15-30 minutos
Opuntia (cacto)	> 65	—
Sempervivum arachnoideum (suculenta)	57-61	—
Folhas da batata	42,5	1 hora
Plântulas de pinheiro e espruce	54-55	5 minutos
Sementes de *Medicago* (alfafa)	120	30 minutos
Uva (fruto maduro)	63	—
Fruto do tomateiro	45	—
Pólen do pinheiro vermelho	70	1 hora
Vários musgos		
Hidratados	42-51	—
Desidratados	85-110	—

Fonte: Tabela 11.2, em Levitt, 1980.

Na mesma planta, o ponto de compensação da temperatura é em geral menor para folhas de sombra do que para folhas de sol expostas à luz (e ao calor). Taxas de respiração elevadas em relação à fotossíntese, sob temperaturas altas, são mais prejudiciais em plantas C_3 do que em plantas C_4 ou CAM, pois as taxas de respiração no escuro e fotorrespiração são aumentadas em plantas C_3 sob temperaturas mais altas (ver Capítulo 8).

As plantas adaptadas a temperaturas baixas se aclimatam fracamente a temperaturas altas

A amplitude com que as plantas adaptadas geneticamente a uma faixa de temperatura podem se aclimatar a uma faixa de temperatura contrastante é ilustrada pela comparação das respostas de duas espécies C4: *Atriplex sabulosa* (armole congelada, família *Chenopodiaceae*) e *Tidestromia oblongifolia* (mel doce do Arizona, família *Amaranthaceae*).

A. sabulosa é nativa do clima frio da costa norte da Califórnia. *T. oblongifolia* é nativa do clima muito quente do Vale da Morte, Califórnia, e cresce em um regime de temperatura que é letal à maioria das espécies vegetais. Quando essas espécies foram sub-

(A) Absorção de CO_2 (porcentagem de controle não-aquecido) — Fotossíntese — *T. oblongifolia*, *A. sabulosa*
(B) Liberação de CO_2 — Respiração
(C) Mudança de condutividade (porcentagem/minutos) — Perda de íons
Temperatura foliar no pré-tratamento (°C)

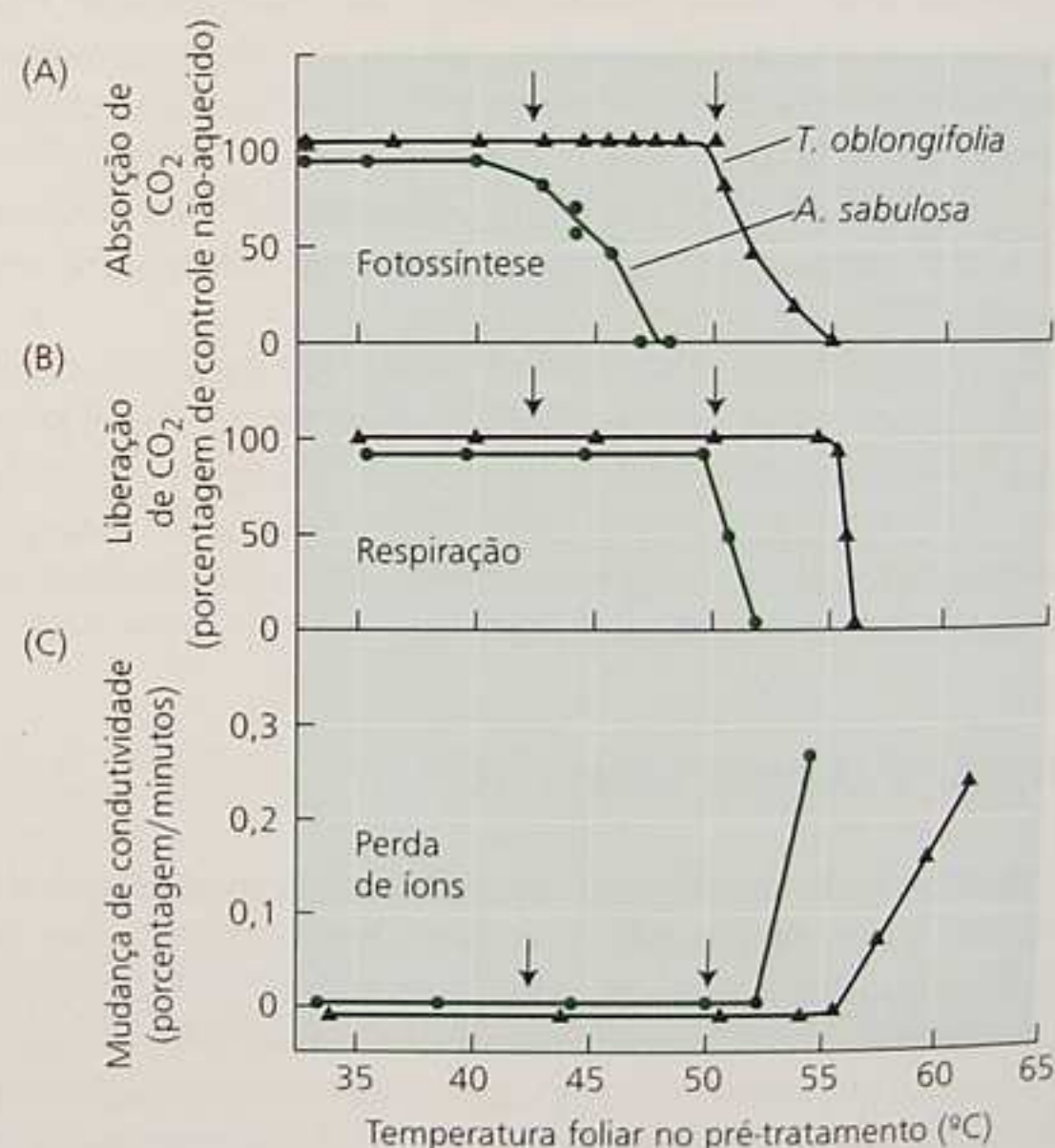



FIGURA 25.10 Resposta da armole congelada (*Atriplex sabulosa*) e do mel doce do Arizona (*Tidestromia oblongifolia*) ao estresse térmico. A fotossíntese (A) e a respiração (B) foram medidas em folhas ligadas à planta, sendo a perda de íons (C) medida em pedaços de folhas submersos em água. No começo do experimento, mediram-se as taxas de controle a 30°C, temperatura não-prejudicial. Folhas ligadas foram, então, por 15 minutos, expostas às temperaturas indicadas e retornaram às condições iniciais de controle, antes que as taxas fossem registradas. As setas indicam as temperaturas limiares para inibição da fotossíntese em cada uma das duas espécies. A fotossíntese, a respiração e a permeabilidade de membrana foram mais sensíveis ao dano pelo calor em *A. sabulosa* do que em *T. oblongifolia*. No entanto, nas duas espécies a fotossíntese foi mais sensível ao estresse térmico do que qualquer dos outros dois processos; ela foi totalmente inibida sob temperaturas não-prejudiciais à respiração (Björkman e cols., 1980).

metidas a condições ambientais controladas e suas taxas de crescimento registradas em função da temperatura, *T. oblongifolia* cresceu escassamente a 16°C, enquanto *A. sabulosa* alcançou 75% da sua taxa máxima de crescimento. Por outro lado, a taxa de crescimento de *A. sabulosa* começa a declinar entre 25 e 30°C e o crescimento cessa a 45°C, temperatura na qual o crescimento de *T. oblongifolia* alcançou o máximo (ver Figura 25.10A) (Björkman e cols., 1980). Claramente, uma espécie não poderia se aclimatar à faixa de temperatura da outra.

A temperatura alta reduz a estabilidade de membrana

A estabilidade de membranas celulares variadas é importante durante o estresse à alta temperatura, assim como o é durante o resfriamento e o congelamento. A excessiva fluidez de lipídeos de membrana a temperaturas altas está relacionada à perda de função. Na espirradeira (*Nerium oleander*), a aclimatação a temperaturas altas está associada a um maior grau de saturação de ácidos graxos em lipídeos de membrana, que torna as membranas menos fluidas (Raison e cols., 1982).

Sob temperatura altas ocorre um decréscimo na força das ligações de hidrogênio e das interações eletrostáticas entre os grupos polares de proteínas na fase aquosa da membrana. Assim, as temperaturas altas modificam a composição e a estrutura da membrana e podem causar perda de íons (ver Figura 25.10C). A ruptura de membrana também causa a inibição de processos como a fotossíntese e a respiração, que dependem da atividade de transportadores de elétrons e enzimas associados a membranas.

A fotossíntese é especialmente sensível à temperatura alta (ver Capítulo 9). Em seu estudo com *Atriplex* e *Tidestromia*, Björkman e colaboradores (1980) constataram que o transporte de elétrons no fotossistema II foi mais sensível à temperatura alta em *A. sabulosa* adaptada ao frio do que em *T. oblongifolia* adaptada ao calor. Nessas plantas, as enzimas ribulose-1,5-bifosfato carboxilase, NADP: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fosfoenolpiruvato carboxilase foram menos estáveis sob temperaturas altas em *A. sabulosa* do que em *T. oblongifolia*.

Entretanto, tais enzimas começaram a desnaturar e a perder atividade sob temperaturas nitidamente mais altas do que aquelas que a fotossíntese começou a decair. Tais resultados sugerem que os estádios iniciais de prejuízo à fotossíntese provocado pelo calor estão mais diretamente relacionados a mudanças nas propriedades de membranas e ao desacoplamento dos mecanismos de transferência de energia nos cloroplastos do que a uma desnaturação geral de proteínas.

Várias adaptações protegem as folhas contra o aquecimento excessivo

Em ambientes com luz solar intensa e temperaturas altas, as plantas evitam o aquecimento excessivo de suas folhas reduzindo a absorção de radiação solar. Essa adaptação é importante em ambientes quentes e ensolarados, nos quais a folha transpirante está próximo ao seu limite superior de tolerância à temperatura. Em tais condições, qualquer aquecimento adicional oriundo do decréscimo de evaporação de água ou do aumento de absorção de energia pode danificar a folha.

A resistência à seca e ao calor depende das mesmas adaptações: tricomas foliares refletivos e ceras foliares; enrolamento foliar e orientação foliar vertical; folhas pequenas, altamente divididas, para minimizar a camada de contato e, assim, maximizar a perda convectiva e condutiva de calor (ver Capítulos 4 e 9). Alguns arbustos de deserto — *Encelia farinosa*, família Compositae, por exemplo — têm folhas dimórficas para evitar o aquecimento excessivo: folhas verdes e quase glabras encontradas no inverno são substituídas por folhas brancas e pubescentes de verão.

Sob temperaturas mais altas, as plantas produzem proteínas de choque térmico

Em resposta a elevações repentinas de temperatura de 5 a 10°C, as plantas produzem um conjunto único de proteínas, identificado como **proteínas de choque térmico** (HSPs; do inglês, *heat shock proteins*). A maior parte das HSPs auxilia as células a suportar o estresse térmico, funcionando como chaperonas moleculares. O estresse térmico faz com que muitas proteínas, que funcionam como enzimas ou componentes estruturais tornem-se estendidas ou maldobradas, levando, assim, à perda da estrutura e da atividade enzimática.

Tais proteínas maldobradas muitas vezes agregam-se e se precipitam, criando sérios problemas dentro da célula. As HSPs atuam como chaperonas moleculares e servem para alcançar um dobramento correto de proteínas maldobradas e agregadas para evitar a deformação de proteínas, o que facilita o funcionamento adequado de células submetidas a temperaturas elevadas.

As proteínas de choque térmico foram descobertas na mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*) e, desde então, têm sido identificadas em outros animais, em humanos, bem como em plantas, fungos e microrganismos. Quando plântulas de soja, por exemplo, são repentinamente mudadas de 25 para 40°C (exatamente abaixo da temperatura letal), a síntese do conjunto de mRNAs e proteínas, comumente encontrados na célula, é suprimida, enquanto a transcrição e a tradução de um conjunto de 30 a 50 outras proteínas (HSPs) são intensificadas. Novos mRNA transcritos para HSPs podem ser detectados três a cinco minutos após o choque térmico (Sachs e Ho, 1986).

Embora as HSPs vegetais tenham sido primeiramente identificadas em resposta a mudanças bruscas de temperatura (25 para 40°C) que raramente manifestam-se na natureza, elas são também induzidas por elevações mais graduais de temperatura, que são representativas do ambiente natural e ocorrem em plantas sob condições de campo. Algumas HSPs são encontradas em células normais, não-estressadas; algumas proteínas essenciais são homólogas às HSPs, mas não aumentam em resposta ao estresse térmico (Vierling, 1991).

As plantas e a maioria dos outros organismos produzem HSPs de tamanhos diferentes, em resposta a aumentos de temperatura (Tabela 25.4). As massas moleculares das HSPs variam de 15 a 104 kDa (quilodáltons) e, com base no tamanho, elas podem ser agrupadas em cinco classes. HSPs diferentes estão localizadas no núcleo, mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático e citosol. Os membros dos grupos HSP60, HSP70, HSP90 e HSP100 atuam como chaperones moleculares, envolvendo estabilização ATP-dependente e dobramento de proteínas, além de reunião de proteínas oligoméricas. Algumas HSPs auxiliam no transporte de polipeptídeos por meio de membranas para o interior de compartimentos celulares. As HSP90s estão associadas a receptores de hormônios em células animais e podem ser necessárias para sua ativação, mas não há informação comparável para plantas.

As HSPs de baixo peso molecular (15 a 30 kDa) são mais abundantes em plantas superiores do que em outros organismos. Enquanto as plantas contêm cinco a seis classes de HSPs de baixo peso molecular, outros eucariontes apresentam apenas uma classe (Buchanan e cols., 2000). As diferentes classes de HSPs de peso molecular de 15 a 30 kDa (smHSPs) em plantas estão distribuídas no citosol, cloroplastos, retículo endoplasmático e mitocôndrias. A função dessas pequenas HSPs não é conhecida.

As células induzidas à síntese de HSPs mostram desenvolvimento da tolerância térmica e podem tolerar exposição a temperaturas que, do contrário, são letais. Algumas HSPs não estão relacionadas exclusivamente ao estresse por temperatura alta. Elas são também induzidas por estresses ou condições ambientais bem diferentes, incluindo déficit hídrico, tratamento por ABA, lesão, temperatura baixa e salinidade. Assim, células anteriormente expostas a um estresse podem se tornar protegidas contra outro estresse. É o caso dos frutos do tomateiro, nos quais o choque térmico (48 horas a 38°C) promove acumulação de HSP e protege as células do resfriamento a 2°C por 21 dias.

Um fator de transcrição intermedeia a acumulação de HSP em resposta ao choque térmico

Todas as células parecem conter chaperonas moleculares que têm expressão constitutiva e funcionam como HSPs. Essas chaperonas são denominadas **proteínas cognatas de choque térmico**. No entanto, quando as células estão sujeitas a um episódio térmico estressante mas não-letal, a síntese de HSPs aumenta drasticamente, enquanto a continuidade da tradução de outras proteínas é bastante diminuída ou cessa. Essa resposta ao choque térmico parece ser mediada por um fator de transcrição específico (HSF), que atua sobre a transcrição de mRNAs de HSP.

Na ausência de estresse térmico, o HSF ocorre como monômeros, os quais são incapazes de se ligarem ao DNA e de dirigir transcrição (Figura 25.11). O estresse faz com que os monômeros HSF associem-se a trímeros, que estão, então, aptos a se ligar a elementos específicos na seqüência de DNA, identificados como elementos de choque térmico (HSEs; do inglês, *heat shock elements*). Uma vez ligado ao HSE, o trímero HSF é fosforilado e promove a transcrição de mRNAs de HSP. Subseqüentemente, HSP70 liga-se ao HSF, levando à dissociação do complexo HSF/HSE e o HSF é reciclado à forma HSF monomérica. Desse modo, pela ação de HSF, HSPs acumulam-se até se tornarem suficientemente abundantes para se ligarem ao HSF, levando à cessação da produção de mRNA de HSP.

As HSPs são mediadores da termotolerância

As condições que induzem tolerância térmica em plantas têm uma íntima correspondência com aquelas que induzem a acumulação de HSPs. No entanto, só essa correlação não prova que as HSPs desempenham um papel essencial na aclimatação ao estresse térmico. Experimentos mais conclusivos mostram que a expressão de um HSF ativado induz a síntese constitutiva de HSPs e aumenta a termotolerância de *Arabidopsis*. Estudos com indivíduos de *Arabidopsis* contendo uma seqüência de DNA anti-senso, que reduz a síntese de HSP70, mostraram que o extremo de temperatura alta, sob o qual as plantas poderiam sobreviver, foi reduzido em 2°C comparado com controle, embora plantas mutantes crescessem normalmente a temperaturas ótimas (Lee e Schoeffl, 1996).

Presumivelmente, a insuficiência para sintetizar a série completa de HSPs que é normalmente induzida nas plantas levaria a uma perda de termotolerância muito mais drástica. Outros estudos com mutantes de *Arabidopsis* (Hong e Vierling, 2000) e plantas transgênicas (Queitsch e cols., 2000) demonstram que ao menos HSP101 é um componente crítico da termotolerância induzida e constitutiva em plantas.

A adaptação ao estresse térmico é mediada por cálcio citosólico

É possível que as enzimas participantes de rotas metabólicas ofereçam respostas térmicas diferentes e tal termoestabilidade diferencial pode afetar passos específicos no metabolismo, antes que as HSPs possam restaurar a atividade por meio da sua capacidade molecular de chaperona. Por isso, o estresse térmico pode causar mudanças no metabolismo, levando à acumulação de alguns metabólitos e à redução de outros. Tais mudanças podem alterar drasticamente a função de rotas metabólicas e conduzir a desequilíbrios de difícil correção.

Além disso, o estresse térmico pode alterar a taxa de reações metabólicas que consomem ou produzem prótons; isso pode afetar a atividade de ATPases de bombeamento de prótons, que bombeiam prótons do citosol para o apoplasto ou vacúolos (ver Capítulo 6). Isso provocaria uma acidificação do citosol, que causaria perturbações metabólicas adicionais durante o estresse. As células

TABELA 25.4
As cinco classes de proteínas de choque térmico encontradas em plantas

Classe HSP	Tamanho (kDa)	Exemplos (*Arabidopsis*/procarióticos)	Localização celular
HSP100	100-114	AtHSP101 / ClpB, ClpA/C	Citosol, mitocôndrias, cloroplastos
HSP90	80-94	AtHSP90 / HtpG	Citosol, retículo endoplasmático
HSP70	69-71	AtHSP70 / DnaK	Citosol/núcleo, mitocôndrias, cloroplastos
HSP60	57-60	AtTCP-1 / GroEL, GroES	Mitocôndrias, cloroplastos
smHSP	15-30	Vários AtHSP22, AtHSP20, AtHSP18.2, AtHSP17.6 / IBPA/B	Citosol, mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático

Fonte: Boston e cols., 1996.

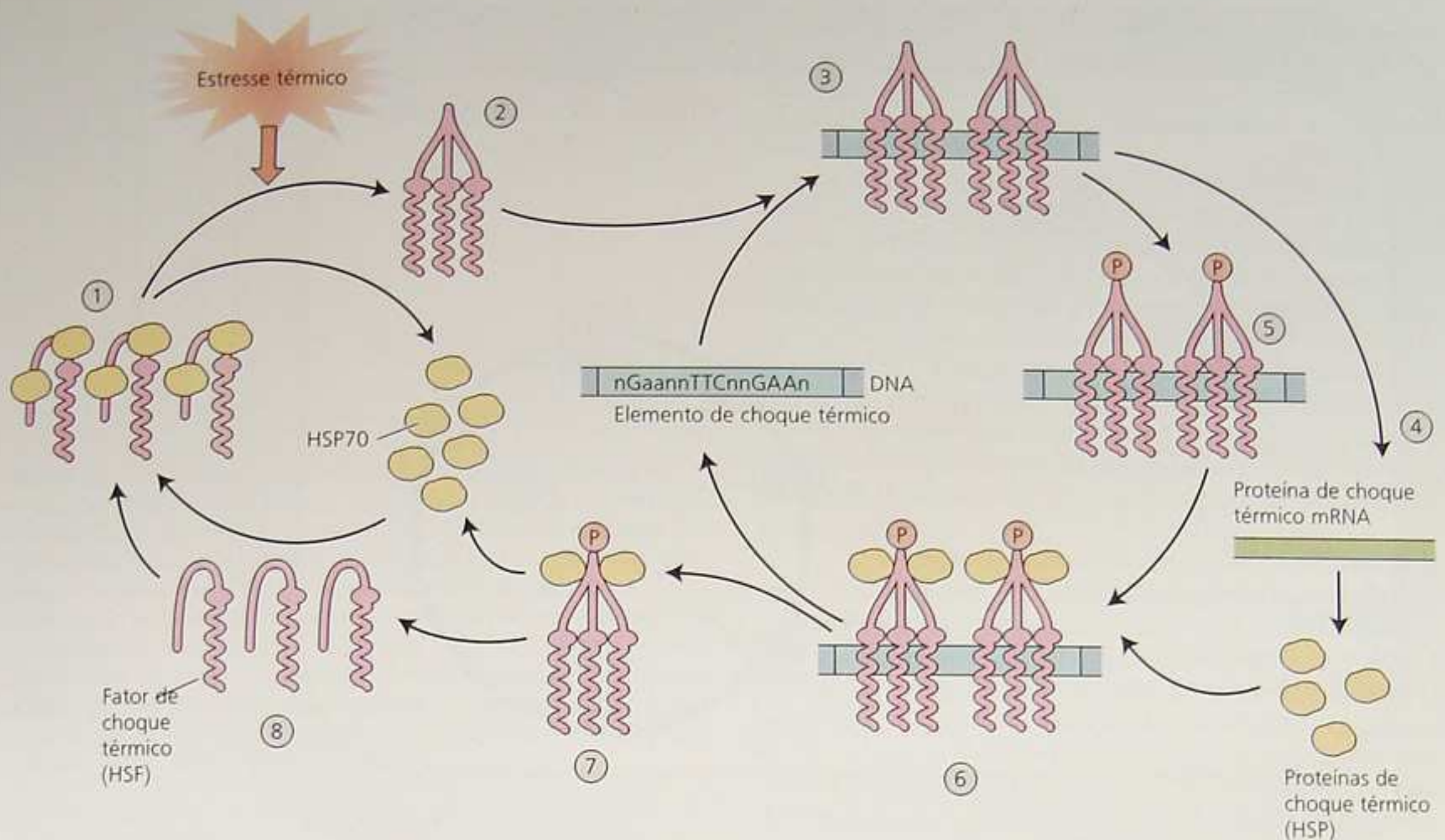



FIGURA 25.11 O ciclo do fator de choque térmico (HSF) ativa a síntese de mRNAs de proteína de choque térmico. Em células não-estressadas, HSF ocorre normalmente no estado monomérico (1) associado a proteínas HSP70. No começo de um episódio de estresse térmico, HSP70 dissocia-se de HSF, que subseqüentemente trimeriza (2). Trímeros ativos ligam-se aos elementos de choque térmico (HSE), nos genes promotores de proteína de choque térmico (HSP), ativando a transcrição de mRNAs de HSP, levando à tradução de HSPs, entre as quais estão HSP70 (4). Os trímeros HSF associados ao HSE são fosforilados (5), facilitando a ligação de HSP70 aos trímeros fosforilados (6). O complexo trímero HSP70 (7) dissocia-se do HSE, separa-se e desfosforila em monômeros HSF (8), que após se liga à HSP, reformando o complexo estacionário HSP70/HSF (Bray e cols., 2000).

podem ter mecanismos de aclimatação metabólica que melhoram estes efeitos de estresse térmico sobre o metabolismo.

Uma das aclimatações metabólicas ao estresse térmico é a acumulação do ácido γ-aminobutírico (GABA), um aminoácido não-protéico. Durante episódios de estresse térmico, o GABA acumula-se em níveis seis a 10 vezes mais altos do que em plantas não-estressadas. O GABA é sintetizado a partir do aminoácido L-glutamato, em uma reação única catalisada pela enzima glutamato descarboxilase (GAD), que é uma das várias enzimas cuja atividade é modulada pela *calmodulina*, uma proteína de regulação ativada pelo cálcio (para detalhes sobre o modo de ação da calmodulina, ver **Capítulo 14 na Internet**).

A calmodulina ativa a GAD (Figura 25.12) e aumenta a taxa de biossíntese de GABA (Snedden e cols., 1995). Em plantas transgênicas expressando a equorina, uma proteína sensível ao cálcio, tem sido verificado que o estresse por temperatura alta eleva os níveis citosólicos de cálcio e que esses aumentos levam à ativação da GAD mediada pela calmodulina e à acumulação do GABA.

Embora o GABA seja uma molécula sinalizadora importante no tecido cerebral de mamíferos, não há evidência de que ele funcione como uma molécula sinalizadora em plantas. As possíveis funções do GABA na resistência ao estresse térmico estão sendo investigadas.

RESFRIAMENTO E CONGELAMENTO

As temperaturas de resfriamento são demasiado baixas para o crescimento normal, mas não suficientemente baixas para a formação de gelo. As espécies tropicais e subtropicais são tipicamente suscetíveis ao dano por resfriamento. Entre os cultivos agrícolas, o milho, o feijoeiro, o arroz, o tomateiro, o pepino, a batata-doce e o algodoeiro são sensíveis ao resfriamento. *Passiflora*, *Coleus* e *Gloxinia* constituem exemplos de plantas ornamentais suscetíveis.

Quando plantas crescendo a temperaturas relativamente altas (25 a 35°C) são esfriadas a 10 até 15°C, ocorre **dano por resfriamento:** o crescimento torna-se mais lento, surgem descoloração ou lesões nas folhas e a folhagem dá a impressão de estar encharcada, como se fosse embebida em água por longo tempo. Se as raízes sofrerem resfriamento, a planta pode murchar.

As espécies geralmente sensíveis ao resfriamento podem mostrar variação apreciável em sua resposta a tais temperaturas. A adaptação genética a temperaturas baixas associada à grande altitude desenvolve resistência ao resfriamento (Figura 25.13). Além disso, a resistência muitas vezes aumenta, se as plantas forem primeiramente aclimatadas por exposição a temperaturas baixas, mas não-danificadoras. Assim, o dano por resfriamento pode ser minimizado, se a exposição for lenta e gradual. A exposição repen-

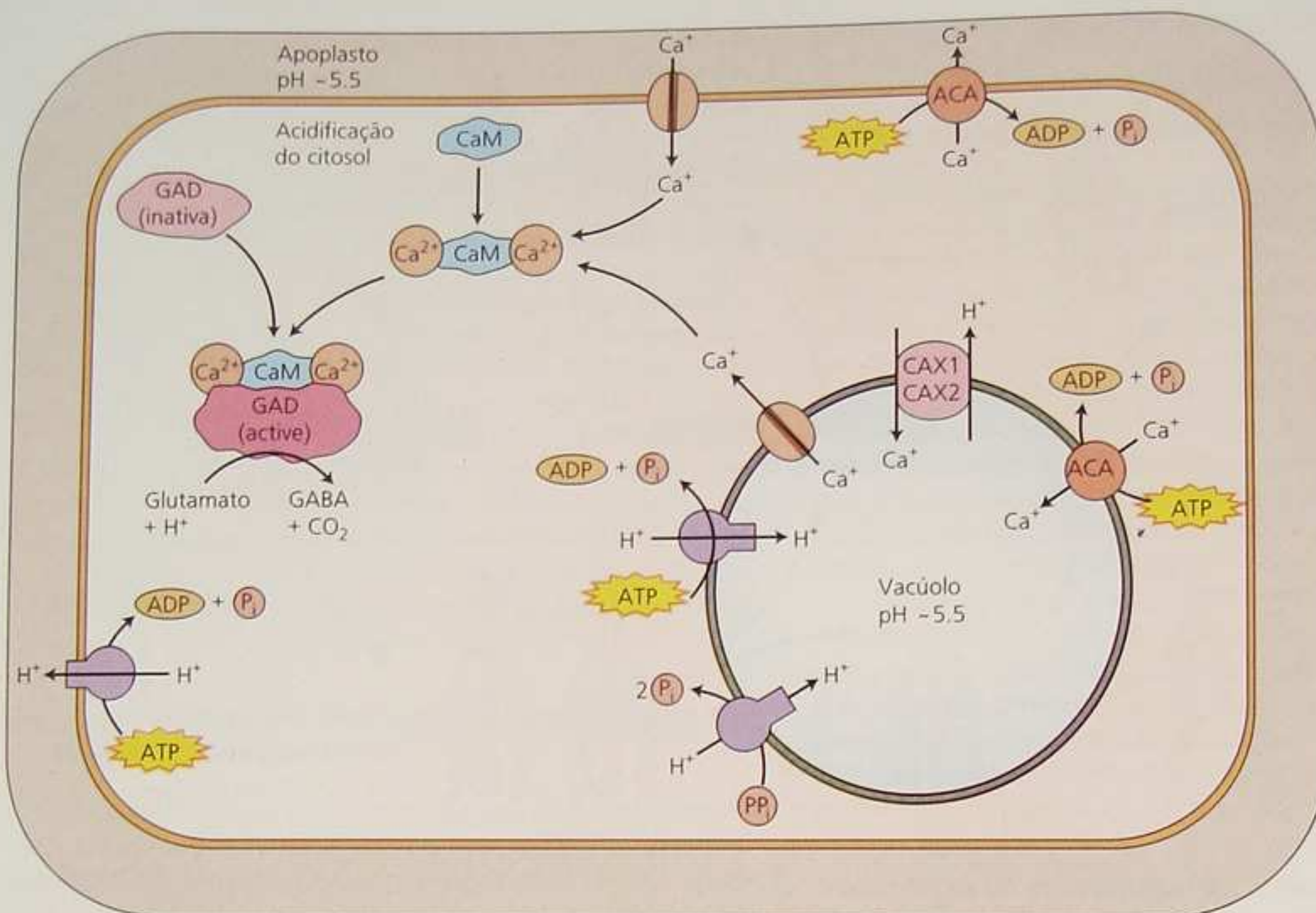



FIGURA 25.12 O estresse térmico causa uma redução no pH citosólico, cujo normal é levemente alcalino, provavelmente por inibição de ATPases de bombeamento de prótons e pirofosfatases, que bombeiam prótons pela membrana plasmática ou para o vacúolo. Adicionalmente, o estresse térmico produz uma mudança na homeostase do cálcio dentro da célula, ao afetar o influxo de cálcio para o citosol pela membrana plasmática ou de canais vacuolares de cálcio ou por ação sobre o efluxo de ATPases ou co-transportadores de prótons. Esse aumento no cálcio citosólico leva à ativação de calmodulina (CaM), que se liga ao glutamato carboxilase (GAD), convertendo-o da forma inativa na ativa. A conversão de glutamato em ácido γ-aminobutírico (GABA) é, então, realizada, consumindo prótons no processo e mediando um aumento no pH citosólico. CAX1 e CAX2 são proteínas de transporte, ACA: Ca^{2+} ATPase.

tina a temperaturas em torno de 0°C, denominada *choque a frio*, aumenta bastante as chances de dano.

O **dano por congelamento,** por outro lado, ocorre a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água. A indução total de tolerância ao congelamento, como com o resfriamento, exige um período de aclimatação a temperaturas baixas.

Na discussão que segue, serão examinados como o dano por resfriamento altera as propriedades de membranas, como os cristais de gelo danificam células e tecidos, bem como o ABA, a expressão gênica e a síntese protéica funcionam como mediadores da aclimatação ao congelamento.

As propriedades das membranas alteram-se em resposta ao dano por resfriamento

As folhas de plantas danificadas por resfriamento mostram inibição da fotossíntese, translocação mais lenta de carboidratos, taxas respiratórias mais baixas, inibição de síntese protéica e aumento da degradação de proteínas existentes. Todas essas respostas parecem depender de um mecanismo primário comum, envolvendo perda de função de membrana durante o resfriamento.

Os solutos liberados pelas folhas de *Passiflora maliformis*, sensível ao resfriamento, por exemplo, flutuam sobre a água a 0°C, mas não os das folhas de *Passiflora coerulea* (maracujá), resistente ao resfriamento. A perda de solutos para a água reflete dano à membrana plasmática e possivelmente também ao tonoplasto. A inibição da fotossíntese e da respiração, por seu turno, resulta em danos às membranas de cloroplastos e mitocôndrias.

Por que as membranas são afetadas pelo resfriamento? As membranas vegetais consistem de uma bicamada lipídica entremeada com proteínas e esteróis (veja Capítulos 1 e 11). As propriedades físicas dos lipídeos têm grande influências sobre as atividades das proteínas integrais de membrana, incluindo H^+-ATPases, transportadores e proteínas formadoras de canais que regulam o transporte de íons e outros solutos (ver Capítulo 6), assim como o transporte de enzimas das quais depende o metabolismo.

Em plantas sensíveis ao resfriamento, os lipídeos na bicamada têm uma percentagem alta de cadeias de ácidos graxos saturados e as membranas com essa composição tendem a se solidificar em um estado semicristalino a uma temperatura bem superior a zero °C. Lembrar de que ácidos graxos saturados que não têm ligações duplas e lipídeos contendo ácidos graxos *trans*-mono-não-sa-

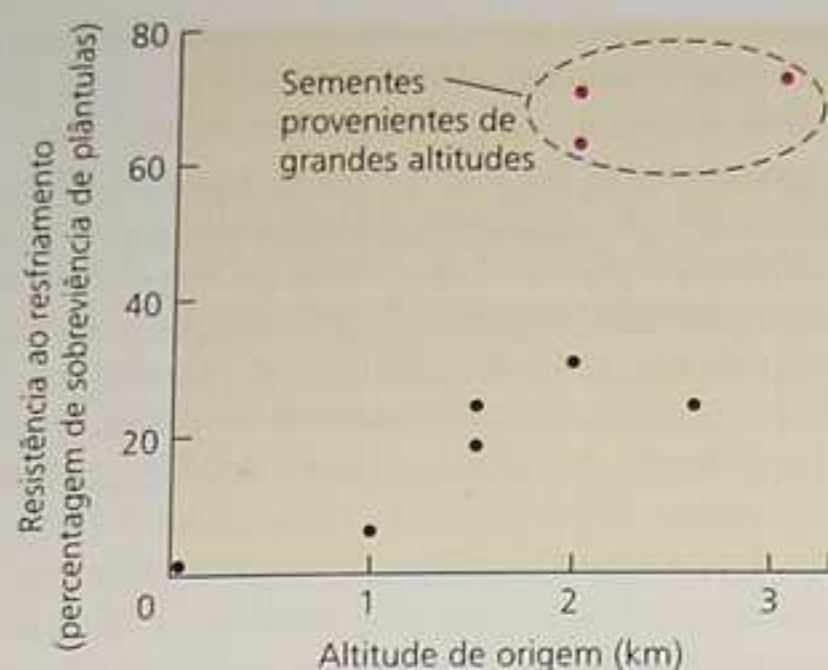



FIGURA 25.13 Sobrevivência à temperatura baixa, de plântulas de populações diferentes de tomateiro, coletadas em altitudes diversas na América do Sul. As sementes foram colhidas do tomateiro selvagem (*Lycopersicon hirsutum*) e germinaram na mesma casa de vegetação, com temperatura entre 18 e 25 °C. Todas as plântulas foram, então, sumetidas ao resfriamento por sete dias a 0°C e depois mantidas por igual período em um ambiente quente, após o que o número de sobreviventes foi contado. As plântulas de sementes coletadas em altitudes grandes mostraram maior resistência ao resfriamento (choque a frio) do que aquelas de sementes provenientes de altitudes mais baixas (Patterson e cols., 1978).

turados solidificam a temperaturas mais altas do que o fazem as membranas compostas de lipídeos que contêm ácidos graxos não-saturados.

Como as membranas tornam-se menos fluidas, seus componentes protéicos podem não mais funcionar normalmente. O resultado é a inibição da atividade da H^+-ATPase, do transporte de solutos para dentro e para fora de células, da transdução de energia (ver Capítulos 7 e 11) e do metabolismo dependente de enzimas. Além disso, as folhas sensíveis ao resfriamento, expostas a altos fluxos de fótons e a temperaturas de resfriamento, são fotoinibidas (ver Capítulo 7), provocando dano agudo ao mecanismo fotossintético.

Os lipídeos de membranas de plantas resistentes ao resfriamento freqüentemente têm uma proporção maior de ácidos graxos não-saturados do que aqueles de plantas sensíveis ao resfriamento (Tabela 25.5); durante a aclimatação a temperaturas baixas aumenta a atividade de enzimas dessaturases e a proporção de lipídeos não-saturados eleva-se (Williams e cols., 1988; Palta e cols., 1993). Essa modificação diminui a temperatura à qual os lipídeos da membrana começam uma gradual mudança de fase de fluido para semi-cristalino e permite às membranas permanecer fluidas sob temperaturas mais baixas. Desse modo, a dessaturação de ácidos graxos fornece alguma proteção contra dano causado pelo resfriamento.

A importância de lipídeos de membrana à tolerância de temperaturas baixas tem sido demonstrada por meio de trabalho com plantas mutantes e transgênicas. Nesse caso, a atividade de enzimas particulares leva a uma mudança específica na composição lipídica da membrana, independente de aclimatação à temperatura baixa. *Arabidopsis*, por exemplo, foi transformada com um gene de *Escherichia coli*, que elevou a proporção de lipídeos de membrana de alto ponto de fusão (saturados). Esse gene aumentou bastante a sensibilidade ao resfriamento das plantas modificadas.

De modo semelhante, os mutantes *fab1* de *Arabidopsis* aumentaram os níveis de ácidos graxos saturados, particularmente 16:0 (ver Tabelas 11.3, 11.4 e 25.5). Durante um período de três a quatro semanas sob temperaturas de resfriamento, a fotossíntese e o crescimento foram gradualmente inibidos; exposição à temperatura de resfriamento, por fim, destruiu os cloroplastos desse mutante. Sob temperaturas de não-resfriamento, os mutantes cresceram tão bem quanto os controles do tipo selvagem (Wu e cols., 1997). (Exemplos adicionais de modificações são encontrados no **Tópico 25.2 na Internet**).

TABELA 25.5
Composição de ácidos graxos de mitocôndrias isoladas de espécies resistentes e sensíveis ao resfriamento

	Peso percentual do conteúdo total de ácidos graxos					
	Espécies resistentes ao resfriamento			Espécies sensíveis ao resfriamento		
Ácidos graxos principais[a]	Gema de couve-flor	Raiz de nabo	Parte aérea da ervilha	Parte aérea do feijoeiro	Batata-doce	Parte aérea de milho
Palmítico (16:0)	21,3	19,0	12,8	24,0	24,9	28,3
Esteárico (18:0)	1,9	1,1	2,9	2,2	2,6	1,6
Oléico (18:0)	7,0	12,2	3,1	3,8	0,6	4,6
Linoléico (18:2)	16,4	20,6	61,9	43,6	50,8	54,6
Linolênico (18:3)	49,4	44,9	13,2	24,3	10,6	6,8
Razão de ácidos graxos não-saturados para saturados	3,2	3,9	3,8	2,8	1,7	2,1

[a]O número de átomos de carbono na cadeia do ácido graxo e o número de ligações duplas são mostrados entre parêntese.
Fonte: Lyons e cols., 1964.

A formação de cristais de gelo e a desidratação do protoplasto matam as células

A capacidade de tolerar temperaturas de congelamento, sob condições naturais, varia bastante entre os tecidos. Sementes, outros tecidos parcialmente desidratados e esporos de fungos podem ser mantidos indefinidamente a temperaturas próximas ao zero absoluto (0 K ou –273°C), indicando que essas temperaturas muito baixas não são intrinsecamente prejudiciais.

Células vegetativas totalmente hidratadas podem também reter a viabilidade, se elas forem esfriadas muito rápido, para evitar a formação de cristais de gelo grandes e de crescimento lento, que poderiam perfurar e destruir estruturas subcelulares. Os cristais de gelo que se formam durante congelamento muito rápido são demasiado pequenos para provocar dano. Inversamente, é necessário o rápido aquecimento de tecido congelado, para evitar a transformação de pequenos cristais de gelo em cristais de tamanhos que possam causar dano ou para evitar a perda de vapor de água por sublimação, pois ambos ocorrem sob temperaturas intermediárias (–100 a –10°C).

Sob condições naturais, o esfriamento de órgãos intactos e multicelulares nunca é suficientemente rápido para se restringir, em células totalmente hidratadas, apenas a formação de cristais de gelo pequenos e inofensivos. O gelo geralmente forma-se primeiro dentro de espaços intercelulares e nos vasos, ao longo dos quais ele pode se propagar rapidamente. Essa formação de gelo não é letal às plantas vigorosas e o tecido se refaz por completo, uma vez aquecido. No entanto, quando as plantas são expostas a temperaturas de congelamento por um período extenso, o crescimento de cristais de gelo extracelulares provoca um movimento de água líquida do protoplasto para o gelo extracelular, causando desidratação excessiva (para uma descrição detalhada deste processo, ver o Tópico 25.3 na Internet).

Durante o congelamento rápido, o protoplasto, incluindo o vacúolo, refrigera, ou seja, a água celular permanece líquida, mesmo sob temperaturas vários graus abaixo do ponto teórico de congelamento. Muitas centenas de moléculas são necessárias para começar a se formar um cristal de gelo. O processo pelo qual essa quantidade de moléculas de água começam a formar um cristal de gelo estável é denominado **nucleação de gelo** e ele depende muito das propriedades das superfícies envolvidas. Alguns polissacarídeos e proteínas grandes facilitam a formação de cristal de gelo e são chamados de nucleadores de gelo.

Algumas proteínas de nucleação de gelo produzidas por bactérias parecem facilitar esse processo, por intermédio do alinhamento de moléculas de água ao longo de repetidos domínios de aminoácidos dentro da proteína. Em células vegetais, os cristais de gelo começam a crescer a partir de nucleadores de gelo endógenos; os cristais de gelo intracelulares resultantes, relativamente grandes, provocam dano extensivo à célula e são, via de regra, letais.

A limitação da formação de gelo contribui para a tolerância ao congelamento

Diversas proteínas vegetais especializadas podem auxiliar a limitar o crescimento de cristais de gelo, por meio de um mecanismo não-coligativo, isto é, um efeito que não depende do abaixamento do ponto de congelamento da água pela presença de solutos. Tais *proteínas anticongelamento* são induzidas por temperaturas baixas, as quais se ligam às superfícies de cristais de gelo, a fim de evitar ou retardar o seu crescimento ulterior.

Em folhas de centeio, as proteínas anticongelamento estão localizadas nas células epidérmicas e em células que delimitam os espaços intercelulares, onde elas podem inibir o crescimento de gelo extracelular. As plantas e os animais podem utilizar mecanismos similares para limitar cristais de gelo: um gene induzível pelo frio, identificado em *Arabidopsis*, tem DNA homólogo a um gene que codifica a proteína anticongelamento em peixes. As proteínas anticongelamento são discutidas com mais detalhes posteriormente neste capítulo.

Os açúcares e algumas das proteínas induzidas pelo frio são suspeitos de terem efeitos crioprotetores (*crio* = frio); eles estabilizam proteínas e membranas durante a desidratação induzida por temperatura baixa. No trigo de inverno, quanto maior a concentração de sacarose, tanto maior também a tolerância ao congelamento. A sacarose predomina entre os açúcares solúveis associados com a tolerância ao congelamento, que funcionam de uma maneira coligativa, mas, em algumas espécies, a rafinose, os frutanos, o sorbitol ou o manitol cumprem a mesma função.

Durante a aclimatação ao frio de cereais de inverno, os açúcares solúveis acumulam-se nas paredes celulares, onde podem restringir o crescimento de gelo. Uma glicoproteína crioprotetora foi isolada das folhas de repolho (*Brassica oleraceae*) aclimatada ao frio. *In vitro*, a proteína protege tilacóides isolados, de espinafre (*Spinacia oleraceae*) não-aclimatado, contra o dano do congelamento e do descongelamento.

Algumas plantas lenhosas podem se aclimatar a temperaturas muito baixas

Em estado dormente, algumas plantas lenhosas são extremamente resistentes a temperaturas baixas. A resistência é determinada, em parte, por aclimatação prévia ao frio, mas a genética desempenha um papel importante na determinação do grau de tolerância a temperaturas baixas. Espécies nativas de *Prunus* (cerejeira, ameixeira, entre outras) de climas mais frios do norte da América do Norte, após aclimatação, apresentam maior fortalecimento do que aquelas de climas mais amenos. Quando testadas juntas no laboratório, as espécies com distribuição geográfica mais ao norte mostraram maior capacidade de evitar formação de gelo intracelular, destacando as diferenças genéticas (Burke e Stushnoff, 1979).

Sob condições naturais, as espécies lenhosas aclimatam-se ao frio em dois estádios distintos (Weiser, 1970):

1. No primeiro estádio, o fortalecimento é induzida no começo do outono, por meio de exposição a dias curtos e temperaturas de resfriamento não-congelantes; esta combinação cessa o crescimento. Um fator difusível que promove aclimatação (provavelmente ABA) move-se no floema das folhas para os caules hibernantes e pode ser responsável pelas mudanças. Durante esse período, as espécies lenhosas também retiram água dos vasos, evitando, assim, a ruptura do caule em resposta à expansão da água durante o congelamento subseqüente. As células neste primeiro estádio de aclimatação podem sobreviver a temperaturas bem abaixo de 0°C, mas elas não estão totalmente fortalecidas.
2. No segundo estádio, o estímulo é a exposição direta ao congelamento; um fator translocável desconhecido pode conferir o fortalecimento resultante de exposição ao congelamento.

Quando totalmente fortalecidas, as células podem tolerar exposição a temperaturas de –50 a –100°C.

A resistência a temperaturas de congelamento envolve superesfriamento e desidratação lenta

Em muitas espécies das florestas latifoliadas do sudeste do Canadá e leste dos Estados Unidos, a aclimatação ao congelamento envolve a supressão da formação de cristal de gelo a temperaturas bem abaixo do ponto teórico de congelamento (para detalhes, ver **Tópico 25.3 na Internet**). Este *superesfriamento profundo* é observado em espécies como o carvalho, o olmeiro, o bordo, a faia, o freixo, a nogueira, a nogueira-amarga, a roseira, o rododendro, a macieira, a pereira, o pessegueiro e a ameixeira (Burke e Stushnoff, 1979). O superesfriamento profundo também ocorre em tecidos de caules e folhas de espécies arbóreas, tais como o espruce de Engelmann (*Picea engelmannii*) e o abeto subalpino (*Abies lasiocarpa*) crescendo nas Montanhas Rochosas do Colorado.

A resistência ao congelamento é rapidamente enfraquecida, uma vez retomado o crescimento na primavera (Becwar e cols., 1981). Os tecidos caulinares do abeto subalpino, que sofrem superesfriamento profundo e permanecem viáveis abaixo de –35°C em maio, perdem a capacidade de suprimir a formação de gelo em junho e podem morrer a –10°C.

As células podem superesfriar somente em torno de –40°C, temperatura à qual o gelo se forma espontaneamente. A formação espontânea de gelo estabelece o *limite inferior de temperatura* no qual muitas espécies alpinas e subárticas que experimentam superesfriamento profundo podem sobreviver. Ela também explica porque a altitude do limite das árvores em altitudes de montanha está na isoterma mínima de –40°C ou próximo disso.

O protoplasto suprime a nucleação de gelo, quando sofre superesfriamento profundo. Além disso, a parede celular atua como uma barreira ao crescimento de gelo dos espaços intercelulares para dentro da parede e à perda de água líquida do protoplasto para o gelo extracelular, que é acionada por um íngreme gradiente de pressão de vapor (Wisniewski e Arora, 1993).

Muitas gemas florais (p. ex., videira, vacínio, pessegueiro, azaléia e corniso) sobrevivem o inverno por superesfriamento profundo, e sérias perdas econômicas, particularmente do pessegueiro, podem resultar do declínio da tolerância ao congelamento das gemas florais na primavera. As células, então, não mais superesfriam e os cristais de gelo que se formam extracelularmente nas escamas das gemas retiram água do meristema apical, matando o ápice floral por desidratação.

As gemas florais da macieira e da pereira, as gemas vegetativas de todas as árvores frutíferas temperadas e as células vivas na sua casca não superesfriam, mas elas resistem à desidratação durante a formação do gelo extracelular. A resistência à desidratação celular é altamente desenvolvida em espécies lenhosas que estão submetidas à temperatura média mínima anual abaixo de –40°C, particularmente aquelas encontradas no norte do Canadá, Alasca, norte da Europa e Ásia.

A formação de gelo começa entre –3 a –5°C nos espaços intercelulares, onde os cristais continuam a crescer, supridos pela retirada gradual de água do protoplasto, que permanece não-congelada. A resistência a temperaturas de congelamento depende da capacidade dos espaços extracelulares de acomodar o volume de cristais de gelo em crescimento e da capacidade do protoplasto de suportar a desidratação.

Esta restrição da formação de cristal de gelo aos espaços extracelulares, acompanhada pela desidratação gradual do protoplasto, pode explicar porque algumas espécies lenhosas resistentes ao congelamento são também resistentes ao déficit hídrico durante a estação de crescimento. Espécies de salseiro (*Salix*), bétula-branca (*Betula papyrifera*), faia-preta (*Populus tremuloides*), cerejeira (*Prunus pensylvanica*), cerejeira silvestre (*Prunus virginiana*) e pinheiro (*Pinus contorta*), por exemplo, toleram temperaturas muito baixas, restringindo a formação de cristais de gelo aos espaços extracelulares. Porém, a aquisição de resistência depende do esfriamento lento e da formação gradual de gelo extracelular e desidratação do protoplasto. A exposição repentina a temperaturas muito baixas antes de aclimatação total causa congelamento intracelular e morte celular.

Algumas bactérias que vivem sobre superfícies foliares aumentam o dano pela geada

Quando folhas são submetidas a temperaturas de –3 a –5°C, a formação de cristais de gelo sobre a superfície (geada) é acelerada por certas bactérias, tais como *Pseudomonas syringae* e *Erwinia herbicola*, que naturalmente habitam a superfície foliar e agem como nucleadores de gelo. Quando inoculadas artificialmente com culturas dessas bactérias, as folhas de espécies sensíveis à geada congelam a temperaturas mais altas que as folhas que estão livres de bactérias (Lindow e cols., 1982). O gelo da superfície rapidamente se expande para os espaços intercelulares dentro da folha, levando à desidratação celular.

Cepas de bactérias podem ser geneticamente modificadas, de modo que elas perdem as suas características de nucleação de gelo. Tais cepas têm sido usadas comercialmente em pulverizações foliares de cultivos de importância agronômica sensíveis à geada, como o morangueiro, para competir com cepas nativas de bactérias e, assim, minimizar o número de pontos potenciais de nucleação de gelo.

O ABA e a síntese protéica estão envolvidos na aclimatação ao congelamento

Em plântulas de alfafa (*Medicago sativa* L.), a tolerância ao congelamento a –10°C é bastante beneficiada pela exposição prévia ao frio (4°C) ou por tratamento com ABA exógeno sem exposição ao frio. Esses tratamentos provocam mudanças no padrão de proteínas recém-sintetizadas, que podem ser decompostas em géis bidimensionais. Algumas das alterações são únicas para o tratamento específico (frio ou ABA), mas algumas das proteínas recém-sintetizadas induzidas pelo frio parecem iguais àquelas induzidas pelo ABA (ver Capítulo 23) ou por déficit hídrico moderado.

A síntese protéica é necessária para o desenvolvimento de tolerância ao congelamento e várias proteínas diferentes se acumulam durante a aclimatação ao frio, como resultado de mudanças na expressão gênica (Guy, 1999). O isolamento dos genes para tais proteínas revela que várias das proteínas induzidas por temperatura baixa compartilham homologia com a família de proteínas RAB/LEA/DHN (responsiva ao ABA, abundante no embrião tardio e desidrina, respectivamente). Como foi descrito na seção sobre regulação gênica por estresse osmótico, essas proteínas acumulam-se em tecidos expostos a estresses diferentes, tal como o estresse osmótico. Suas funções estão sendo pesquisadas.

O ABA parece ter um papel na indução de tolerância ao congelamento. O trigo de inverno, o centeio, o espinafre e *Arabidopsis*

thaliana são espécies tolerantes ao frio, que, quando fortalecidas por escassez de água, sua tolerância ao congelamento também aumenta. Essa tolerância ao congelamento é aumentada, sob temperaturas que não são de aclimatação, por déficit hídrico moderado ou a temperatura baixas, que elevam as concentrações do ABA endógeno em folhas.

As plantas desenvolvem tolerância ao congelamento sob temperaturas que não promovem a aclimatação, quando tratadas com ABA exógeno. Muitos dos genes ou proteínas expressos a temperaturas baixas ou sob déficit hídrico são também induzíveis pelo ABA sob condições de não-aclimatação. Estas descobertas suportam um papel do ABA na tolerância ao congelamento.

Os mutantes de *Arabidopsis* insensíveis ao ABA (*abi1*) ou deficientes em ABA (*aba1*) são incapazes de suportar aclimatação de baixa temperatura para congelamento. Apenas em *aba1*, no entanto, a exposição ao ABA recupera a capacidade de desenvolver tolerância ao congelamento (Mantyla e cols., 1995). Por outro lado, nem todos os genes induzidos por temperatura baixa são dependentes do ABA e ainda não está claro se a expressão de genes induzidos pelo ABA é crítica para o desenvolvimento integral da tolerância ao congelamento. As pesquisas sobre a tolerância de coroas do centeio ao congelamento, por exemplo, têm mostrado que a temperatura letal para 50% delas (LT_{50}) é –2 a –5°C para controles crescendo a 25°C, –8°C para coroas tratadas com ABA e –28°C após aclimatação a 2°C.

O ABA claramente exógeno não pode conferir a mesma aclimatação ao congelamento obtida pela exposição a temperaturas baixas. Culturas de células de *Bromus inermis* mostram uma indução mais drástica de tolerância ao congelamento, quando tratadas com ABA: enquanto os controles crescendo a 25°C podem sobreviver a –9°C, sete dias de exposição ao ABA melhoraram a tolerância ao congelamento para –40°C (Gusta e cols., 1996).

Tipicamente, é exigido um mínimo de vários dias de exposição a temperaturas baixas para a resistência ao congelamento ser totalmente induzida. A batata exige 15 dias de exposição ao frio. Por outro lado, quando reaquecidas, as plantas perdem rapidamente sua tolerância ao congelamento; elas podem se tornar suscetíveis ao congelamento novamente em 24 horas.

A necessidade de temperaturas baixas para induzir aclimatação ao resfriamento ou congelamento e a rápida perda de aclimatação sob aquecimento explicam a suscetibilidade de plantas no sul dos Estados Unidos (e zonas climáticas similares com invernos altamente variáveis) a extremos de temperatura nos meses de inverno, quando a temperatura do ar pode cair de 20 a 25°C para menos de 0°C em poucas horas.

Numerosos genes são induzidos durante a aclimatação ao frio

A expressão de certos genes e a síntese de proteínas específicas são comuns tanto no estresse pelo calor quanto pelo frio, mas alguns aspectos da expressão gênica induzível pelo frio diferem daqueles produzidos pelo estresse por calor (Thomashow, 2001). Enquanto durante os episódios de frio a síntese de proteínas de "manutenção" (proteínas produzidas na ausência de estresse) não é substancialmente modificada, durante o estresse por calor a síntese de proteína de manutenção é essencialmente cessada.

Por outro lado, a síntese de várias proteínas de choque térmico que podem atuar como chaperonas moleculares é totalmente regulada sob estresse pelo frio, da mesma maneira como o é durante o estresse por calor. Isto sugere que a desestabilização de proteínas acompanha tanto o estresse por calor quanto pelo frio e que mecanismos para estabilização da estrutura protéica durante episódios de calor e frio são importantes para a sobrevivência.

Uma outra classe importante de proteínas cuja expressão é totalmente regulada por estresse pelo frio está representada pelas **proteínas anticongelamento.** Tais proteínas foram descobertas em peixes que vivem em água sob o gelo das calotas polares. Conforme já discutido, essas proteínas têm a capacidade de inibir o crescimento de cristais de gelo de uma maneira não-coligativa, evitando, assim, danos sob temperaturas de congelamento intermediárias. As proteínas anticongelamento conferem às soluções aquosas a propriedade de *histerese térmica* (a transição do líquido para o sólido é promovida a uma temperatura mais baixa do que a transição do sólido para o líquido), de modo que às vezes elas são identificadas como **proteínas da histerese térmica** (THPs; do inglês, *thermal hysteresis proteins*).

Em monocotiledôneas resistentes ao inverno, têm sido descobertos vários tipos de proteínas anticongelamento, induzidas pelo frio. Quando os genes específicos codificadores dessas proteínas foram clonados e sequenciados, descobriu-se que todas as proteínas anticongelamento pertencem à classe das endoquitinases e endoglucanases, que são induzidas por infecção de patógenos diferentes. Tais proteínas, denominadas **proteínas relacionadas à patogênese (PR)**, são consideradas protetoras de plantas contra patógenos. Assim, parece que, pelo menos em moncotiledôneas, o papel duplo dessas proteínas, relacionado ao anticongelamento e à patogênese, seria de proteção das células contra o estresse pelo frio e o ataque de patógenos.

Proteínas de um outro grupo, associadas ao estresse osmótico (ver a discussão anterior neste capítulo), são também totalmente reguladas durante o estresse pelo frio. O grupo inclui proteínas envolvidas na síntese de *osmólitos*, proteínas de estabilização de membrana e as proteínas LEA. Uma vez que a formação extracelular de cristais de gelo gera estresses osmóticos significativos dentro das células, para suportar o estresse por congelamento também são necessárias as medidas para enfrentar o estresse osmótico.

Um fator de transcrição regula a expressão gênica induzida pelo frio

Mais de 100 genes são totalmente regulados por estresse pelo frio. O estresse pelo frio está claramente relacionado a respostas ao ABA e ao estresse osmótico, razão pela qual nem todos os genes totalmente regulados por estresse pelo frio necessariamente precisam relacionar-se à tolerância ao frio, mas provavelmente muitos deles o são. Inúmeros genes induzidos por estresse pelo frio são ativados por ativadores transcricionais denominados **fatores de ligação de repetição de C (CBF1, CBF2, CBF3**, também chamados de DREB1b, DREB1c e DREB1a, respectivamente) (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Os fatores de transcrição do tipo CBF/DREB1 ligam-se aos **elementos CRT/DRE** (elementos de seqüência de repetição de C/responsivos à desidratação, independentes do ABA) em seqüências promotoras de genes, que foram discutidas anteriormente no capítulo. Há envolvimento de CBF/DREB1 na resposta transcricional coordenada de numerosos genes regulados pelo estresse osmótico e pelo frio, todos contendo os elementos CRT/DRE em seus promotores. CBF1/DREB1b é única, por ser induzida experimentalmente por estresse pelo frio e não por estresses osmótico ou sa-

lino, enquanto os elementos de ligação DRE do tipo DREB2 (discutido anteriormente na seção sobre estresses osmóticos) são induzidos apenas por estresses osmótico e salino, mas não pelo frio.

A expressão de CBF1/DREB1b é controlada por um fator de transcrição separado, denominado ICE (ICE = *inducer of CBF expression*, ou seja, indutor de expressão de CBF). Os fatores de transcrição de ICE não parecem ser induzidos pelo frio e presume-se que o ICE ou uma proteína associada é ativado pós-transcricionalmente, permitindo a ativação de CBF1 (DREB1b, mas a(s) rota(s) exata(s) de sinalização de percepção do frio, sinalização do cálcio e a ativação do ICE estão, no momento, sendo pesquisadas.

Plantas transgênicas constitutivamente expressando CBF1 têm mais transcritos gênicos totalmente regulados pelo frio do que as plantas selvagens. Isto sugere que numerosas proteínas totalmente super-reguladas pelo frio, que podem estar envolvidas na aclimatação ao frio, são produzidas, na ausência de frio, nestas plantas transgênicas CBF1. Além disso, as plantas transgênicas CBF1 são mais tolerantes ao frio do que as plantas-controle.

ESTRESSE SALINO

Sob condições naturais, as plantas superiores terrestres encontram altas concentrações de sal na costa marítima e em estuários, onde a água do mar e a água doce se encontram ou se sucedem com as marés. No interior, a infiltração salina natural de depósitos geológicos marinhos pode avançar em áreas adjacentes, tornando-as inutilizáveis para a agricultura. No entanto, um problema muito maior na agricultura é a acumulação de sais provenientes da água de irrigação.

A evaporação e a transpiração removem água pura (sob forma de vapor) do solo e esta perda de água concentra solutos no solo. Quando a água de irrigação contém uma alta concentração de solutos e quando não há possibilidade de descarregar os sais acumulados para um sistema de drenagem, eles podem rapidamente alcançar níveis prejudiciais às espécies sensíveis ao sal. Estima-se que cerca de um terço da área irrigada na Terra é afetado pelo sal.

Nesta seção, discute-se como a fisiologia da planta é afetada pela salinidade na água e no solo, além de se examinar os processos que auxiliam as plantas a evitar o estresse salino.

A acumulação de sal nos solos prejudica o funcionamento da planta e a estrutura do solo

Ao examinar os efeitos de sais no solo, estabelece-se a distinção entre altas concentrações de Na^+ identificadas como **sodicidade**, e altas concentrações de sais totais, referidas como **salinidade.** Ambos os conceitos estão muitas vezes relacionados, mas, em algumas áreas, Ca^{2+}, Mg2+, SO_4^{2-} e NaCl podem contribuir substancialmente para a salinidade. A alta concentração de Na^+ de um solo sódico pode não apenas prejudicar diretamente as plantas, mas também degradar a estrutura do solo, decrescendo a porosidade e a permeabilidade à água. Um solo argiloso sódico, conhecido como *caliche*, de tão duro e impermeável, precisa às vezes ser dinamitado para poder ser escavado.

No campo, a salinidade da água do solo ou da água de irrigação é medida quanto à sua condutividade elétrica ou quanto ao seu potencial osmótico. A água pura é um condutor de corrente elétrica muito pobre; a condutividade de uma amostra de água deve-se aos íons nela dissolvidos. Quanto mais alta a concentração salina na água tanto maior é a sua condutividade elétrica e tanto mais baixo é o seu potencial osmótico (mais alta a pressão osmótica) (Tabela 25.6).

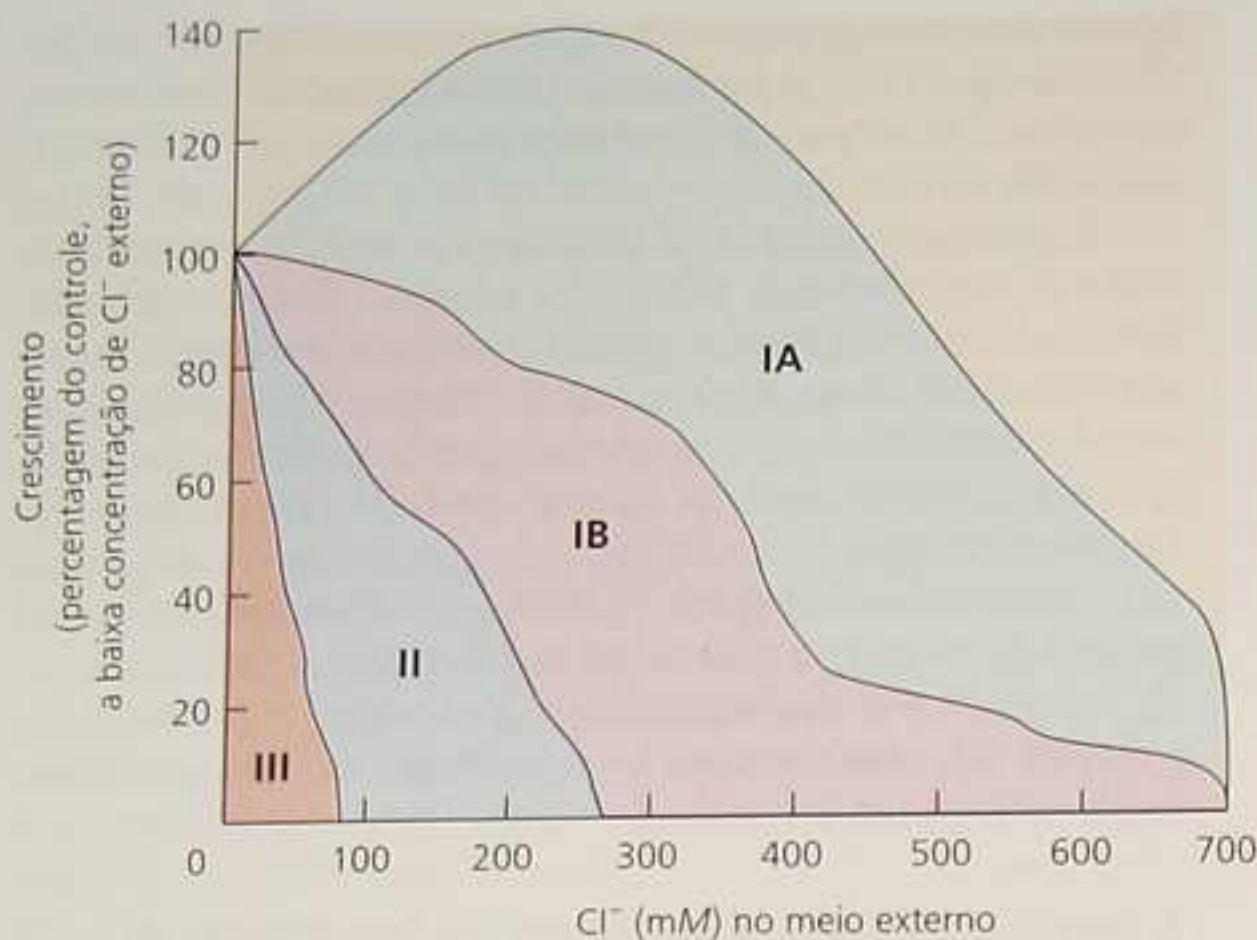
A qualidade da água de irrigação em regiões semi-áridas e áridas é freqüentemente pobre. Nos Estados Unidos, o conteúdo de sal nas nascentes do Rio Colorado é de somente 50 mg L^{-1}, mas a cerca de 2.000 km a jusante, no sul da Califórnia, ele alcança aproximadamente 900 mg L^{-1}, o suficiente para impedir o crescimento de algums cultivos agrícolas sensíveis ao sal, tal como o milho. A água de alguns poços usados para irrigação no Texas pode possuir um conteúdo de sal de 2.000 a 3.000 mg L^{-1}. Uma aplicação anual de água de irrigação totalizando 1 m de um desses poços adicionaria ao solo 20 a 30 toneladas de sais por hectare (8 a 12 toneladas por acre). Tais níveis de sais são prejudiciais à maioria das culturas agrícolas resistentes.

A salinidade reduz o crescimento e a fotossíntese de espécies sensíveis

As plantas podem ser divididas em dois grupos amplos, com base na sua resposta às altas concentrações de sais. As **halófitas** são nativas de solos salinos e completam seu ciclo de vida naqueles ambientes. As **glicófitas** (literalmente, "plantas doces") ou não-halófitas, não têm resistência ao sal no mesmo grau que as halófitas. Geralmente, existe um limiar de concentração de sal acima do qual as glicófitas começam a mostrar sinais de inibição do crescimento, descoloração foliar e perda do peso seco.

Entre as espécies cultivadas, o milho, a cebola, as cítricas, a nogueira-pecã, a alface e o feijoeiro são altamente sensíveis ao sal; o algodão e a cevada são moderadamente tolerantes; a beterraba e a tamareira são altamente tolerantes (Greenway e Munns, 1980). Algumas espécies altamente tolerantes ao sal, tais como *Suaeda maritima* (uma planta de pântano salgado) e *Atriplex nummularia* (um arbusto de solo salgado) exibem estimulação ao crescimento sob concentrações de Cl^- muitas vezes maior do que o nível letal para espécies sensíveis (Figura 25.14).

TABELA 25.6
Propriedades da água do mar e da água de boa qualidade para irrigação

Propriedade	Água do mar	Água de irrigação
Concentração de íons (m*M*)		
Na^+	457	< 2,0
K^+	9,7	< 1,0
Ca^{2+}	10	0,5-2,5
Mg^{2+}	56	0,25-1,0
Cl^-	536	< 2,0
SO_4^{2-}	28	0,25-2,5
HCO_3^-	2,3	< 1,5
Potencial osmótico (MPa)	−2,4	−0,039
Sais totais dissolvidos (mg L^{-1} ou ppm)	32.000	500

O **grupo IA (halófitas)** inclui *Suaeda maritima* e *Atriplex nummularia*. Essas espécies mostram estimulação ao crescimento com níveis de Cl^- abaixo de 400 n*M*.

O **grupo IB (halófitas)** inclui *Spartina x townsendii* e a beterraba (*Beta vulgaris*). Essas plantas toleram sal, mas seu crescimento é retardado.

O **grupo II (halófitas e não-halófitas)** inclui gramíneas halofíticas tolerantes ao sal, desprovidas de glândulas de sal, tais como *Festuca rubra* subsp. *littoralis* e *Puccinellia peisonis*, além de não-halófitas, tais como o algodão (*Gossypium* spp.) e a cevada (*Hordeum vulgare*). Todas são inibidas por concentrações altas. Neste grupo, o tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) é intermediário e o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) e a soja (*Glycine max*) são sensíveis.

As espécies do **grupo III (não-halófitas muito sensíveis ao sal)** são severamente inibidas ou mortas por concentrações baixas de sal. Neste grupo, são incluídas muitas árvores frutíferas, tais como as cítricas, o abacateiro e frutíferas de caroço.

FIGURA 25.14 O crescimento de espécies diferentes submetidas à salinidade, em relação ao de controles não-salinizados. As curvas dividindo as regiões são baseadas em dados de espécies diferentes. As plantas cresceram durante um a seis meses (Greenway e Munns, 1980).

O dano pelo sal envolve efeitos osmóticos e efeitos iônicos específicos

Os solutos dissolvidos na zona das raízes geram um potencial osmótico baixo (mais negativo), que diminui o potencial hídrico do solo. Assim, o balanço hídrico geral das plantas é afetado, pois, para se desenvolver, as folhas necessitam de um potencial hídrico ainda mais baixo, a fim de manter um gradiente "para baixo" de potencial hídrico entre o solo e as folhas (ver Capítulo 4). Esse efeito de solutos dissolvidos é similar ao de um déficit hídrico do solo (conforme discutido anteriormente neste capítulo) e a maioria das plantas responde aos níveis excessivos de salinidade no solo do mesmo modo como descrito antes para o déficit hídrico.

A principal diferença entre os ambientes de baixo potencial hídrico causado por salinidade *versus* dessecação do solo é a quantidade total de água disponível. Durante a dessecação do solo, a planta pode obter uma quantidade limitada de água do seu perfil, causando sempre decréscimo dos potenciais hídricos. Na maioria dos ambientes salinos, uma quantidade grande (ilimitada) de água está disponível, a um potencial hídrico baixo e constante.

De importância especial é o fato de que a maior parte das plantas pode se ajustar osmoticamente, quando crescendo em solos salinos. Tal ajuste evita a perda de turgor (que retardaria o crescimento celular; ver Figura 25.1) ao gerar um potencial hídrico mais baixo, mas essas plantas muitas vezes continuam a crescer mais lentamente após tal ajuste, por uma razão desconhecida que, curiosamente, não está relacionada ao turgor insuficiente (Bressan e cols., 1990).

Além das respostas das plantas ao potencial hídrico baixo, **efeitos de toxicidade** iônica específicos também ocorrem, quando concentrações prejudiciais de íons — particularmente Na^+, Cl^- ou SO_4^{2-} — acumulam-se nas células. Sob condições não-salinas, o citosol de células de plantas superiores contém 100 a 200 m*M* de K^+ e 1 a 10 m*M* de Na^+, um ambiente iônico onde muitas enzimas alcançam o seu ótimo. Uma razão anormalmente alta de Na^+ para K^+ e concentrações altas de sais totais inativam as enzimas e inibem a síntese protéica. Em pêlos radiculares do algodão, uma concentração alta de Na^+ pode deslocar Ca^{2+} da membrana plasmática, determinando uma mudança na sua permeabilidade, que pode ser detectada pela saída de K^+ das células (Cramer e cols., 1985).

A fotossíntese é inibida quando concentrações altas de Na^+ e/ou Cl^- acumulam-se nos cloroplastos. Uma vez que o transporte de elétrons na fotossíntese parece relativamente insensível a sais, o metabolismo do carbono ou a fotofosforilação podem ser afetados. As enzimas extraídas de espécies tolerantes ao sal são exatamente tão sensíveis à presença de NaCl quanto o são as enzimas de glicófitas sensíveis ao sal. Portanto, a resistência de halófitas a sais não é uma conseqüência de metabolismo de resistência ao sal. Em vez disso, outros mecanismos entram em ação para evitar o dano pelo sal, conforme será discutido na próxima seção.

As plantas usam estratégias diferentes para evitar o dano pelo sal

As plantas minimizam o dano pelo sal ao excluí-lo de meristemas, em particular na parte aérea, e de folhas que estão se expandindo de forma ativa e fotossintetizando. Em plantas sensíveis ao sal, a resistência a níveis moderados de salinidade no solo depende em parte da capacidade das raízes de impedir que íons potencialmente prejudiciais alcancem as partes aéreas.

Lembrar do Capítulo 4, que mostra que a estria de Caspary impõe uma restrição aos movimentos de íons para o xilema. Ao desviar das estrias de Caspary, os íons necessitam se mover do apoplasto para a rota simplástica, atravessando as membranas celulares. Essa transição oferece às plantas resistentes ao sal um mecanismo para excluir parcialmente íons prejudiciais.

Os íons de sódio penetram nas raízes passivamente (por movimento descendente no gradiente de potencial eletroquímico; ver

Capítulo 6), de modo que as células das raízes devem usar energia para expelir Na^+ ativamente de volta para a solução externa. Em contraste, Cl^- é expelido pelo potencial elétrico negativo através da membrana celular e baixa permeabilidade das membranas plasmáticas da raiz para este íon. O movimento de Na^+ para as folhas é posteriormente minimizado por absorção de Na^+ da corrente de transpiração (seiva do xilema), durante seu movimento das raízes para os caules e folhas.

Algumas plantas resistentes ao sal, tais como *Tamarix* sp. e *Atriplex* sp., não eliminam íons pelas raízes, mas, em vez disso, têm glândulas de sal na superfície das folhas. Os íons são transportados para essas glândulas, onde o sal cristaliza e já não é prejudicial. Em geral, as halófitas possuem uma capacidade maior de acumulação de íons em células da parte aérea do que as glicófitas.

Embora algumas plantas, como as de mangue, cresçam em ambientes salinos com abundante suprimento hídrico, elas necessitam realizar ajustes osmóticos para obter água do ambiente externo com baixo potencial hídrico. Como já foi discutido em relação ao déficit hídrico, as células vegetais podem ajustar seu potencial hídrico (Ψ_w) em resposta ao estresse osmótico, pelo abaixamento do seu potencial de soluto (Ψ_s). Dois processos intracelulares contribuem para o decréscimo do Ψ_s: a acumulação de íons no vacúolo e a síntese de solutos compatíveis no citosol.

Conforme já mencionado neste capítulo, os solutos compatíveis incluem glicina betaína, prolina, sorbitol, manitol, pinitol e sacarose. Determinadas famílias vegetais tendem a usar um ou dois desses compostos em detrimento dos outros. A quantidade de carbono empregada para a síntese desses solutos orgânicos pode ser um tanto grande (cerca de 10% do peso da planta). Em vegetação natural, esse desvio do carbono para ajustar o potencial hídrico não afeta a sobrevivência, mas em cultivos agrícolas ele pode reduzir o crescimento e, por isso, a biomassa total e as produtividades das colheitas.

Muitas halófitas exibem um ótimo de crescimento sob níveis moderados de salinidade; este ótimo está relacionado à capacidade de acumular íons no vacúolo, onde eles podem contribuir para o potencial osmótico da célula sem danificar as enzimas sensíveis ao sal. Em uma menor extensão, este processo também ocorre em glicófitas mais sensíveis ao sal, mas o ajuste pode ser mais lento.

Além de fazer ajustes no potencial hídrico, as plantas, ao se ajustarem ao estresse salino, submetem-se às outras aclimatações relacionadas ao estresse osmótico descritas anteriormente para o déficit hídrico. As plantas submetidas ao estresse salino podem, por exemplo, reduzir a área foliar ou perder folhas por abscisão, justamente durante episódios de estresse osmótico. Além disso, as mudanças na expressão gênica associadas ao estresse osmótico estão similarmente associadas ao estresse pela salinidade. No entanto, é necessário ter em mente que, além da aclimatação a um ambiente com baixo potencial hídrico, as plantas sob estresse salino precisam fazer frente à toxicidade de concentrações iônicas altas presentes nestes ambientes.

A exclusão de íons é crítica para a aclimatação e a adaptação ao estresse salino

Em termos de energia metabólica, o uso de íons para o balanço do potencial hídrico em um ambiente salino tem claramente um custo energético menor para a planta do que o uso de carboidratos ou aminoácidos, cuja produção tem um custo de energia significativamente mais alto. Por outro lado, concentrações iônicas altas são tóxicas para muitas enzimas citosólicas, de modo que os íons devem ser acumulados no vacúolo, para minimizar as concentrações tóxicas no citosol.

Visto que o NaCl é o sal mais abundante encontrado por plantas sob estresse salino, os sistemas de transporte que facilitam a compartimentação de Na^+ para o vacúolo são críticos (Binzel e cols., 1988). Tanto Ca^{2+} quanto K^+ afetam as concentrações intracelulares de Na^+ (Zhong e Läuchli, 1994). Sob concentrações altas de Na^+, é inibida a absorção de K^+ por meio de um transportador com afinidade alta a K^+-Na^+, HKT1, e o transportador opera como um sistema de absorção de Na^+ (Figura 25.15). O cálcio, por outro lado, aumenta a seletividade K^+/Na^+ e, assim procedendo, aumenta a tolerância ao sal (Liu e Zhu, 1997).

O sódio é transportado através da membrana plasmática e do tonoplasto

Conforme discutido no Capítulo 6, as bombas de H^+ na membrana plasmática e tonoplasto fornecem a força motora (potencial eletroquímico de H^+) para o transporte secundário de íons (ver Figura 25.15). Uma ATPase é principalmente responsável pelo grande ΔpH e o gradiente de potencial de membrana encontrados pela membrana plasmática. Uma H^+-ATPase vacuolar gera um ΔpH e um potencial de membrana através do tonoplasto (Hasegawa e cols., 2000).

A atividade dessas bombas é necessária para o transporte secundário de excesso de íons associado a respostas das plantas ao estresse salino, o que é indicado pelas descobertas mostrando que a atividade dessas bombas de H^+ é aumentada pela salinidade, e parte dessa super-regulação pode ser atribuída à expressão gênica induzida.

O transporte de Na^+ energia-dependente (efluxo) do citosol de células vegetais, via da membrana plasmática, é mediado por um produto do gene *SOS1* (*salt overly sensitive 1* = demasiadamente sensível ao sal), que funciona como um transportador de Na^+-H^+ do tipo antiporte (Figura 25.16). O transportador de SOS1 do tipo antiporte é regulado pelos produtos gênicos de, pelo menos, dois outros genes, identificados como *SOS2* e *SOS3* (Shi e cols., 2000). O SOS2 é uma serina/treonina quinase, aparentemente ativada por cálcio através da função de SOS3, uma fosfatase regulada pelo cálcio (para detalhes sobre a sinalização de Ca^{2+} e a família dos gene SOS, ver **Tópico 25.4 na Internet**).

A compartimentação vacuolar de Na^+ resulta, em parte, da atividade de uma família de transportadores de Na^+-H^+do tipo antiporte, tal como *Arabidopsis* AtNHX1 (ver Figura 25.15). Indivíduos transgênicos de *Arabidopsis* e de tomateiro, por superexpressão do gene que codifica AtNHX1, exibem acentuada tolerância ao sal (Apse e cols., 1999; Quintero e cols., 2000). (Para detalhes sobre estudos moleculares da compartimentação do Na^+, ver **Tópico 25.5 na Internet**). Tais descobertas moleculares constituem outro exemplo da riqueza de novas informações que emergem de estudos sobre plantas transgênicas, seqüenciamneto de genes e caracterização de proteínas (para detalhes sobre pesquisas com plantas transgênicas para estudos sobre estresse, ver **Tópico 25.6 na Internet**).

DEFICIÊNCIA DE OXIGÊNIO

As raízes em geral obtêm oxigênio (O_2) suficiente para a respiração aeróbica (ver Capítulo 11) diretamente do espaço gasoso

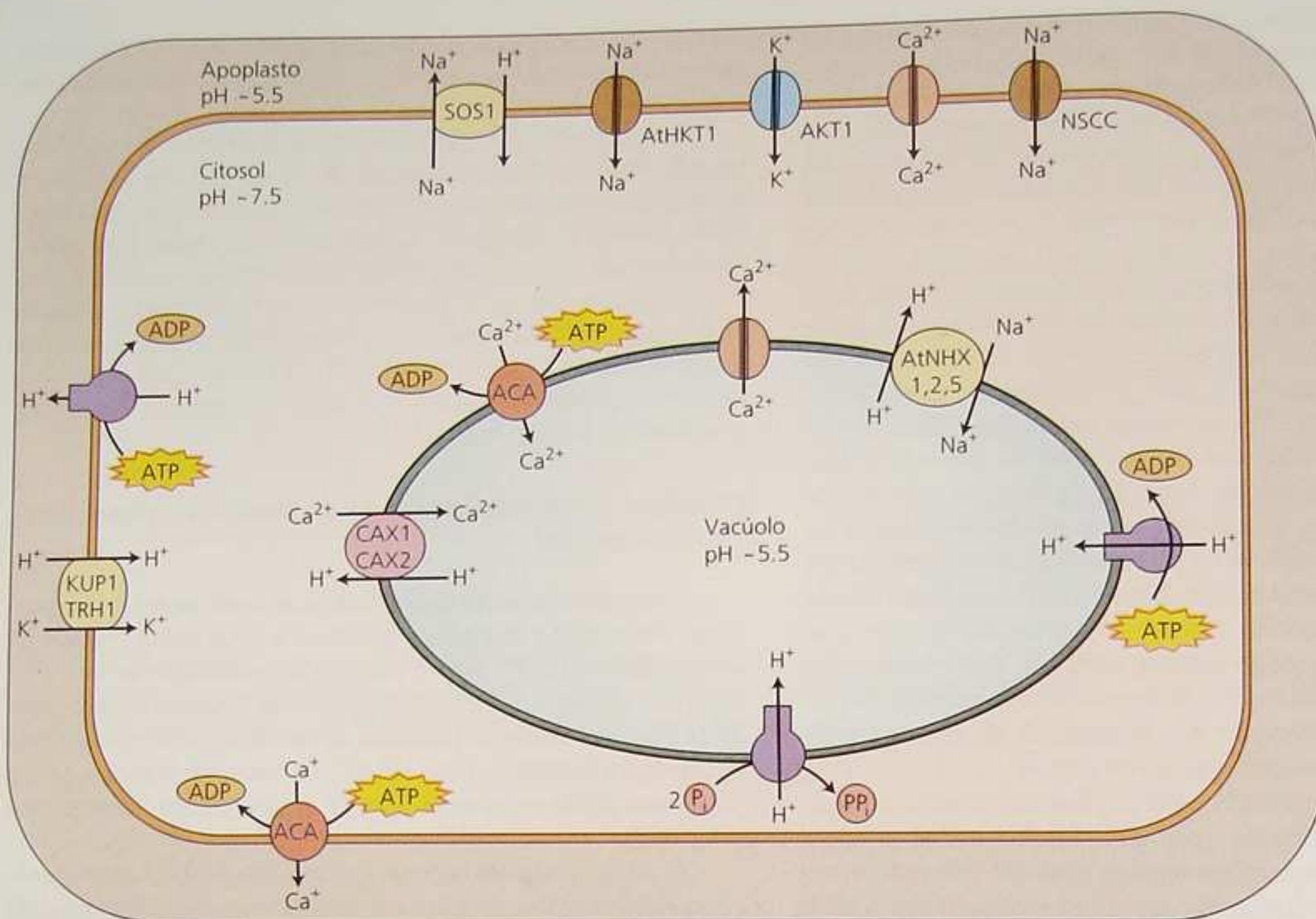



FIGURA 25.15 Proteínas de transporte de membrana mediando o transporte de sódio, potássio e cálcio durante o estresse salino. SOS1, transportador de Na^+/H^+ do tipo antiporte via membrana plasmática; ACA, Ca^{2+}-ATPase via membrana plasmática/tonoplasto; KUP1/TRH1, co-transportador de K^+-H^+ de alta afinidade; AtHKT1, transportador de influxo de sódio; AKT1, canal de K^+ para dentro; NSCC, canal não-seletivo de cátion; CAX1 ou 2, antiporter Ca^{2+}/H^+; AtNHX1, 2 ou 5, transportador de Na^+/H^+ do tipo antiporte via endomembrana. Também estão indicadas nas figura as proteínas implicadas na homeostase iônica, mas cuja identidade molecular não é conhecida nem confirmada em plantas, incluindo as proteínas do canal de cálcio na membrana plasmática e no tonoplasto, bem como ATPases e pirofosfatases do bombeamento vacuolar de prótons. A diferença de potencial de membrana através da membrana plasmática é de 120 a 200 mV, negativa no interior; através do tonoplasto, é de 0 a 20 mV, positiva no interior.

no solo. Os poros preenchidos de gás, em um solo bem-drenado e bem-estruturado, permitem prontamente a difusão de O_2 gasoso para profundidades de vários metros. Conseqüentemente, a concentração de O_2 profunda no solo é semelhante à do ar úmido. No entanto, o solo pode se tornar inundado, quando ele é pobremente drenado ou quando a chuva ou irrigação é excessiva. A água, então, preenche os poros e bloqueia a difusão de O_2 na fase gasosa. O oxigênio dissolvido difunde-se tão lentamente em água estagnada que apenas poucos centímetros de solo próximo à superfície permanecem oxigenados.

Quando as temperaturas são baixas e as plantas estão dormentes, o esgotamento de oxigênio é muito lento e as conseqüências são relativamente inofensivas. Entretanto, quando as temperaturas são mais altas (maiores do que 20°C), o consumo pelas raízes, a fauna do solo e os microrganismos podem exaurir o oxigênio da água do solo em menos de 24 horas.

As **plantas sensíveis à inundação** são danificadas severamente em 24 horas de anoxia (falta de oxigênio). O crescimento e a sobrevivência de muitas espécies vegetais são bastante prejudicados sob tais condições e as produtividades dos cultivos podem ser severamente reduzidas. A produtividade da ervilha de jardim (*Pisum sativum*), por exemplo, pode ser reduzida pela metade em 24 horas de inundação, o que coloca a espécie no grupo das plantas sensíveis a tais condições de excesso de água. Outras plantas, particularmente as espécies não-adaptadas a crescer sob condições continuamente úmidas e muitas plantas de lavoura, são afetadas pela inundação de uma maneira mais moderada, sendo consideradas tolerantes a esta situação. As **plantas tolerantes à inundação** podem suportar temporariamente a anoxia, mas não por períodos superiores a poucos dias.

Por outro lado, a vegetação natural especializada encontrada em terras úmidas, tais como pântanos e charcos, e cultivos, como o do arroz, estão bem-adaptados a resistir à deficiência de oxigênio no ambiente das raízes. As plantas de terras úmidas crescem e sobrevivem durante períodos superiores a meses com seus sistemas de raízes em condições anóxicas. A maioria destas plantas tem adaptações especiais, as quais permitem que o oxigênio disponível em ambientes próximos chegue aos tecidos mantidos em condições anóxicas. Praticamente todas as plantas necessitam de oxigênio quando estão envolvidas em atividade metabólica rápida. As plan-

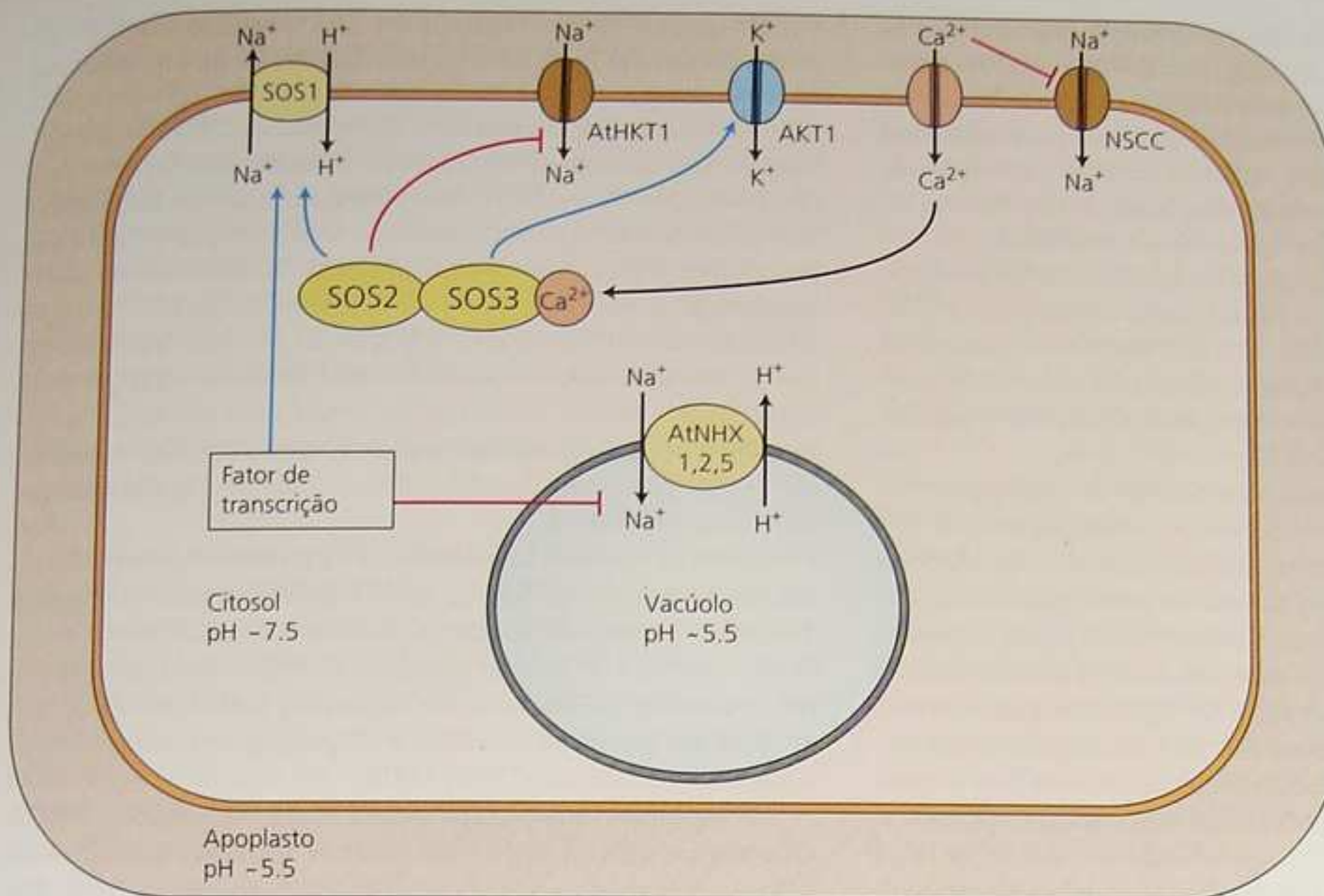



FIGURA 25.16 A regulação da homeostase iônica pela rota SOS de transdução de sinal, estresse salino e níveis de cálcio. As setas vermelhas indicam regulação positiva do transporte de proteínas efetuado e as setas azuis, a regulação negativa. As proteínas mostradas em amarelo são ativadas pelo estresse salino. SOS1, transportador de Na^+/H^+ do tipo antiporte via membrana plasmática; SOS2, serina/treonina quinase; SOS3, proteína de ligação de Ca^{2+}; HKT1, transportador de influxo de sódio; AKT1, canal de K^+_{in}; NSCC, canal não-seletivo de cátion; NHX1, 2 ou 5, transportador de Na^+/H^+ do tipo antiporte via endomembrana; em laranja é mostrada uma proteína de canal de cálcio indeterminada. O estresse salino ativa um canal de cálcio, levando a um aumento do cálcio citosólico, que ativa a cascata SOS por meio de SOS3. A cascata SOS deve regular negativamente HKT1, que, por sua vez, regula secundariamente AKT1. Ao mesmo tempo, a cascata SOS aumenta a atividade de SOS1 e AKT1. Trabalhando através de um fator de transcrição ainda indefinido, a cascata SOS aumenta a transcrição de SOS1, enquanto decresce a transcrição de gene (s) NHX. Com pouco cálcio, o NSCC pode também funcionar como um sistema alternativo de influxo de sódio, mas esse transportador é inibido sob níveis de cálcio altos. A diferença de potencial de membrana através da membrana plasmática é tipicamente de 120 a 200 mV, negativa no interior, e a do tonoplasto é de 0 a 20 mV, positiva no interior.

tas podem ser classificadas de acordo com o tempo que elas conseguem suportar condições anóxicas no ambiente de suas raízes, sem demonstrar dano substancial.

Nas seções seguintes, discute-se o dano causado por anaerobiose às raízes e às partes aéreas, como a vegetação de terra úmida enfrenta baixas tensões de oxigênio e as diferentes aclimatações ao estresse por anoxia, que distinguem as espécies tolerantes das suscetíveis à inundação.

Os organismos anaeróbicos são ativos em solos saturados de água

Quando o solo está esgotado de O_2 molecular, a função dos seus micróbios torna-se importante para a vida e o crescimento das plantas. Os microrganismos de solo anaeróbico (anaeróbios) obtêm sua energia da redução de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) ou a óxido nitroso (N_2O) e nitrogênio molecular (N_2). Esses gases (N_2O e N_2) são perdidos para a atmosfera, por um processo denominado desnitrificação. Como as condições tornam-se mais redutoras, os anaeróbios reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} e, por causa da sua maior solubilidade, o Fe^{2+} pode elevar-se a concentrações tóxicas, quando alguns solos permanecem anaeróbicos durante muitas semanas. Outros anaeróbios podem reduzir sulfato (SO_4^{2-}) a sulfeto de hidrogênio (H_2S), que é um veneno respiratório.

Quando os anaeróbios possuem um suprimento abundante de substrato orgânico, os metabólitos bacterianos, tais como ácido acético e ácido butírico, são liberados para a água do solo. Esses ácidos, em companhia de compostos de enxofre reduzidos, são responsáveis pelo odor desagradável de solo inundado. Todas essas substâncias produzidas por microrganismos sob condições anaeróbicas, em concentrações altas, são tóxicas para plantas.

As raízes são danificadas em ambientes anóxicos

A taxa de respiração e o metabolismo das raízes são atingidos mesmo antes de o O_2 ser esgotado do seu ambiente. A **pressão de oxigênio crítica** (COP; do inglês, *critical oxygen pressure*) é aquela em que a taxa de respiração é primeiro retardada pela deficiência de O_2. A COP do ápice da raiz de milho crescendo em uma solução nutritiva bem ventilada, a 25°C, é de cerca de 0,20 atmosferas (20

kPa ou 20% de O_2 por volume), quase a concentração no ambiente aéreo. A essa pressão parcial de oxigênio (ver **Tópico 9.3 na Internet**, para discussão sobre pressões parciais), a taxa de difusão de O_2 dissolvido da solução para o tecido e de célula para célula mal acompanha a taxa de utilização de O_2. No entanto, um ápice de raiz é muito ativo metabolicamente, com taxas de respiração e reposição de ATP comparáveis às de tecidos de mamíferos.

Em zonas mais velhas da raiz, onde as células estão maduras e totalmente vacuoladas e a taxa de respiração é mais baixa, a COP muitas vezes situa-se na faixa de 0,1 a 0,05 atmosfera. Quando as concentrações de O_2 estão abaixo da COP, o centro da raiz torna-se *anóxico* (completamente carente de oxigênio) ou *hipóxico* (parcialmente deficiente de oxigênio).

A COP é mais baixa quando a velocidade da respiração é reduzida sob temperaturas mais baixas; ela também depende do volume do órgão e de quão firmemente as células estão dispostas. Os frutos grandes e volumosos são capazes de permanecer totalmente aeróbicos, por causa dos espaços intercelulares grandes que facilitam a difusão gasosa. Para células únicas, uma pressão parcial de O_2 de cerca de 0,01 atmosfera (1% do O_2 na fase gasosa) pode ser adequada, pois a difusão por distâncias curtas garante um suprimento apropriado de O_2 às mitocôndrias. Uma pressão parcial de O_2 muito baixa junto à mitocôndria é suficiente para manter a fosforilação oxidativa.

O valor K_m (constante de Michaelis-Menten; ver **Capítulo 2 na Internet**) para citocromo oxidase é 0,1 a 1,0 μ*M* de O_2 dissolvido, uma fração minúscula da concentração do O_2 dissolvido em equilíbrio com o ar (277 μ*M* a 20°C). A grande diferença entre os valores de COP de um órgão ou tecido e as exigências de O_2 de mitocôndrias são explicadas pela difusão lenta de O_2 dissolvido no meio aquoso.

Na ausência de O_2, cessam o transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, o ciclo do ácido tricarboxílico não pode operar e o ATP pode ser produzido apenas por fermentação. Assim, quando o suprimento de O_2 é insuficiente para a respiração aeróbica, as raízes primeiramente começam a fermentar piruvato (formado na glicólise; ver Capítulo 11) a lactato, pela ação da lactato desidrogenase (LDH) (Figura 25.17). Nos ápices das raízes de milho, a fermentação do lactato é transitória, porque o pH intracelular reduzido rapidamente leva a uma mudança da fermentação do lactato para a fermentação do etanol. Esta modificação ocorre por causa dos diferentes ótimos de pH das enzimas citosólicas envolvidas.

A um pH ácido, a LDH é inibida e a piruvato descarboxilase é ativada. O rendimento líquido de ATP na fermentação é de apenas dois moles por mol de hexose respirada (comparado com 36 moles de ATP por mol de hexose respirada na respiração aeróbica). Assim, o dano ao metabolismo das raízes, por deficiência de O_2, origina-se em parte da falta de ATP para governar processos metabólicos essenciais (Drew, 1997).

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) foi usada para medir o pH intracelular de ápices vivos de raízes de milho, sob condições não destrutivas (Roberts e cols., 1992). Em células saudáveis, os conteúdos vacuolares são mais ácidos (pH 5,8) do que o citoplasma (pH 7,4). Mas, sob condições de extrema deficiência de O_2, os prótons saem gradualmente do vacúolo para

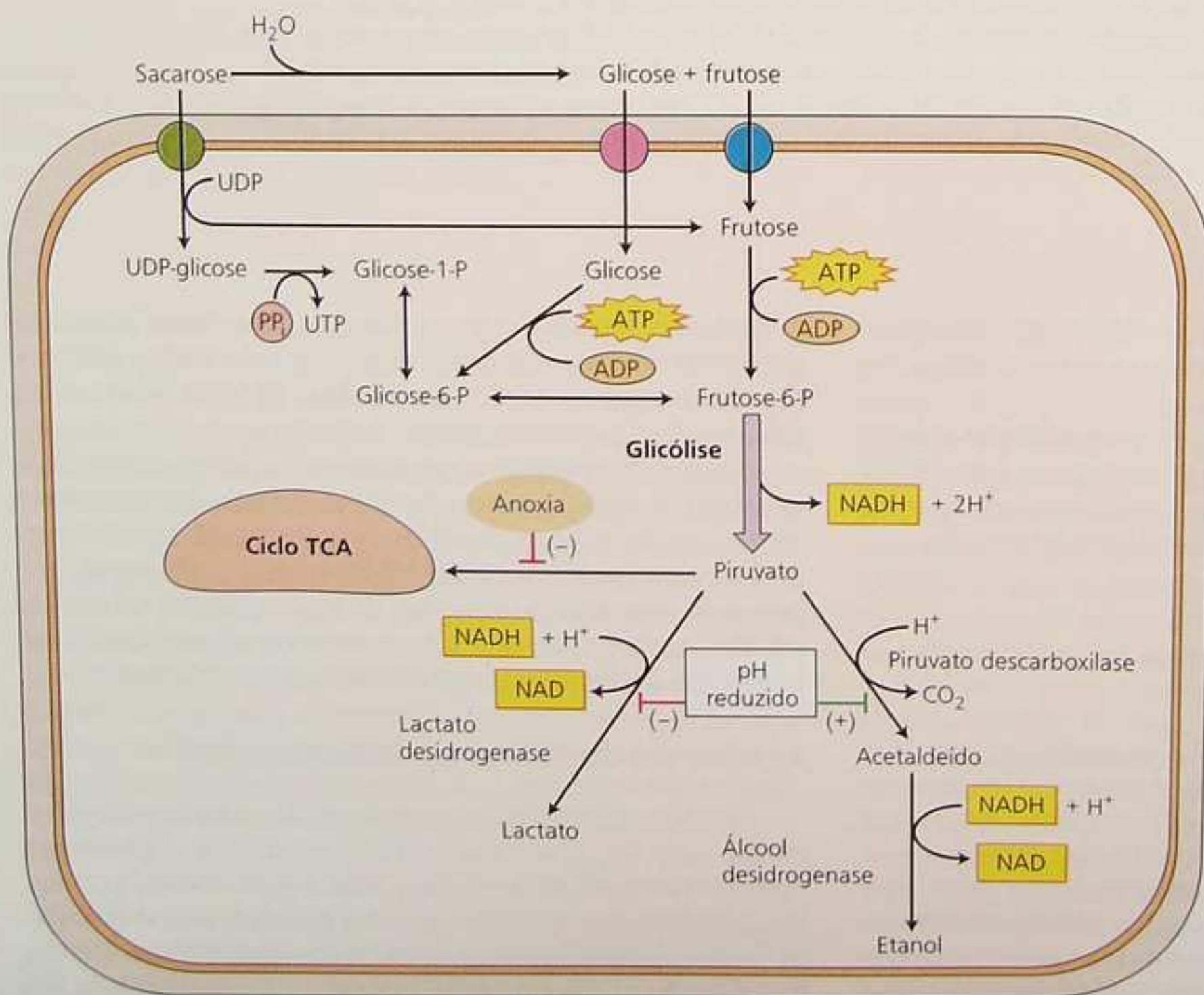



FIGURA 25.17 Durante episódios de anoxia, o piruvato produzido pela glicólise é inicialmente fermentado a lactato. A produção de prótons pela glicólise e outras rotas metabólicas, assim como o decréscimo da translocação de prótons através da membrana plasmática e do tonoplasto levam a um abaixamento do pH citosólico. Com pHs mais baixos, a atividade da lactato desidrogenase é inibida e a piruvato descarboxilase é ativada, conduzindo a um aumento na fermentação de etanol e um decréscimo na fermentação de lactato em pHs mais baixos. A rota de fermentação de etanol consome mais prótons do que a rota de fermentação de lactato. Isto aumenta o pH citosólico e acentua a capacidade da planta de sobreviver em episódio de anoxia.

o citoplasma, somando-se à acidez gerada na ruptura inicial da fermentação do ácido láctico. Tais mudanças de pH (*acidose citosólica*) estão associadas ao começo da morte celular.

Aparentemente, o transporte ativo de H^+ para o vacúolo através de ATPases no tonoplasto torna-se lento pela falta de ATP; sem atividade de ATPase, o gradiente normal de pH entre citosol e vacúolo não pode ser mantido. A acidose citosólica rompe irreversivelmente o metabolismo no citoplasma de células de plantas superiores, assim como em células anóxicas de animais. O ritmo e o grau a que a acidose citosólica está limitada são os fatores primários que distinguem as espécies sensíveis das tolerantes à inundação.

As raízes danificadas por deficiência de O_2 prejudicam as partes aéreas

Às raízes anóxicas ou hipóxicas falta energia suficiente para sustentar processos fisiológicos dos quais dependem as partes aéreas. Experimentos têm mostrado que a deficiência das raízes de trigo ou cevada em absorver íons de nutrientes e transportá-los para o xilema (e deste para a parte aérea) rapidamente leva à escassez de íons nos tecidos em desenvolvimento e expansão. As folhas velhas senescem prematuramente por causa da realocação de elementos móveis no floema (N,P,K) para as folhas jovens. A permeabilidade mais baixa das raízes à água freqüentemente leva a um decréscimo do potencial hídrico da folha e à murcha, embora este decréscimo seja temporário se os estômatos fecharem, evitando mais perda de água por transpiração.

A hipoxia também acelera a produção do precursor de etileno **ACC (1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico)** nas raízes (ver Capítulo 22). No tomateiro, o ACC se move via seiva do xilema para a parte aérea, onde, em contato com o oxigênio, através da ACC oxidase ele é convertido em etileno. As superfícies superiores (adaxiais) dos pecíolos do tomateiro e girassol possuem células responsivas ao etileno, que se expandem com mais rapidez quando as concentrações desse hormônio são altas. Esta expansão resulta em epinastia, o crescimento para baixo das folhas, que, nesta condição, parecem cair. Diferentemente da murcha, a epinastia não envolve perda de turgor.

Em algumas espécies (p. ex., ervilha e tomateiro), a inundação induz fechamento estomático, aparentemente sem mudanças detectáveis no potencial hídrico da folha. A escassez de oxigênio em raízes, da mesma forma que o déficit hídrico ou concentrações altas de sais, pode estimular a produção do ácido abscísico (ABA) e o seu movimento para as folhas. Todavia, o fechamento estomático sob estas condições pode ser atribuído principalmente à produção adicional de ABA pelas folhas mais velhas, localizadas mais abaixo. Estas folhas murcham e exportam seu ABA para as folhas túrgidas mais jovens, levando ao fechamento estomático (Zhang e Zhang, 1994).

Os órgãos submersos podem obter O_2 por meio de estruturas especializadas

Ao contrário das espécies sensíveis e das tolerantes à inundação, a vegetação de terra úmida está bem-adaptada a crescer por longos períodos em solo saturado de água. Mesmo quando as partes aéreas estão em parte submersas, suas espécies crescem vigorosamente e não exibem sinais de estresse.

Em algumas espécies de terra úmida, tal como o nenúfar (*Nymphoides peltata*), a submersão captura etileno endógeno e o hormônio estimula o alongamento celular do pecíolo, estendendo-o prontamente até a superfície da água, de modo que a folha é capaz de alcançar o ar. Os entrenós de arroz de água profunda (flutuante) responde de maneira similar ao etileno capturado, fazendo com que as folhas estendam-se acima da superfície da água, a despeito do aumento da profundidade da coluna d'água. No caso de *Potamogeton pectinatus*, uma monocotiledônea aquática, o alongamento do caule é insensível ao etileno; em vez disso, o alongamento é promovido mesmo sob condições anaeróbicas, por acidificação da água circunjacente causada pela acumulação de CO_2 respiratório.

Na maioria das plantas de terras úmidas e em muitas plantas que se aclimatam bem às condições úmidas, o caule e as raízes desenvolvem canais preenchidos de ar interconectados longitudinalmente, que oferecem uma rota de baixa resistência para o movimento de oxigênio e outros gases. Esses gases (ar) entram pelos estômatos ou através de lenticelas em caules e raízes lenhosos, deslocando-se por difusão molecular ou por convecção movida por pequenos gradientes de pressão.

Em muitas plantas de terras úmidas, exemplificadas pelo arroz, as células estão separadas por espaços proeminentes preenchidos de ar, que formam um tecido denominado **aerênquima**, desenvolvido nas raízes independentemente de estímulos ambientais. No entanto, em poucas plantas não-ocorrentes nesses ambientes úmidos, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, a deficiência de oxigênio induz a formação de aerênquima na base do caule e em raízes novas (Figura 25.18).

No ápice da raiz do milho, a hipoxia estimula a atividade de ACC sintase e ACC oxidase, fazendo com que ACC e etileno sejam produzidos mais rapidamente. O etileno leva à morte e desintegração de células no córtex da raiz. Os locais anteriormente ocupados por estas células propiciam os vazios preenchidos de ar que facilitam o movimento de O_2.

A morte celular sinalizada pelo etileno é altamente seletiva; as células da raiz não destinadas a morrer não são afetadas. Uma elevação da concentração de Ca^{2+} citosólico é considerada parte da rota de transdução de sinal do etileno, levando à morte celular. As substâncias químicas que elevam a concentração de Ca^{2+} citosólico promovem morte celular sob condições não-indutoras; inversamente, as substâncias que diminuem a concentração de Ca^{2+} citosólico bloqueiam a morte celular em raízes hipóxicas que normalmente formariam aerênquima. A morte celular etileno-dependente em resposta à hipoxia é um exemplo de *morte celular programada*, que foi discutida no Capítulo 16 (Drew e cols., 2000).

Algumas plantas (ou parte delas) podem tolerar exposição a condições estritamente anaeróbicas por um período prolongado (semanas ou meses), antes de desenvolver aerênquima, as quais incluem o embrião e o coleóptilo do arroz e do capim-arroz (*Echinochloa cruz-galli* var. *oryzicola*), além de rizomas (caules subterrâneos horizontais) do junco-gigante (*Schoenoplectus lacustris*), junco-de-pântano-salgado (*Scirpus maritimus*) e taboa-de-folha-estreita (*Typha angustifolia*). Os rizomas podem sobreviver por vários meses e expandir suas folhas em uma atmosfera anaeróbica.

Na natureza, os rizomas hibernam na lama anaeróbica das margens dos lagos. Na primavera, com as folhas já expandidas acima da lama ou da superfície da água, pelo aerênquima, o O_2 difunde-se para baixo em direção ao rizoma. O metabolismo passa então de um processo anaeróbico (fermentativo) para um aeróbico e as raízes começam a crescer usando o oxigênio disponível. Da mesma maneira, durante a germinação do arroz irrigado e do capim-arroz, o coleóptilo emerge e torna-se a rota de difusão de O_2

(A) (A)

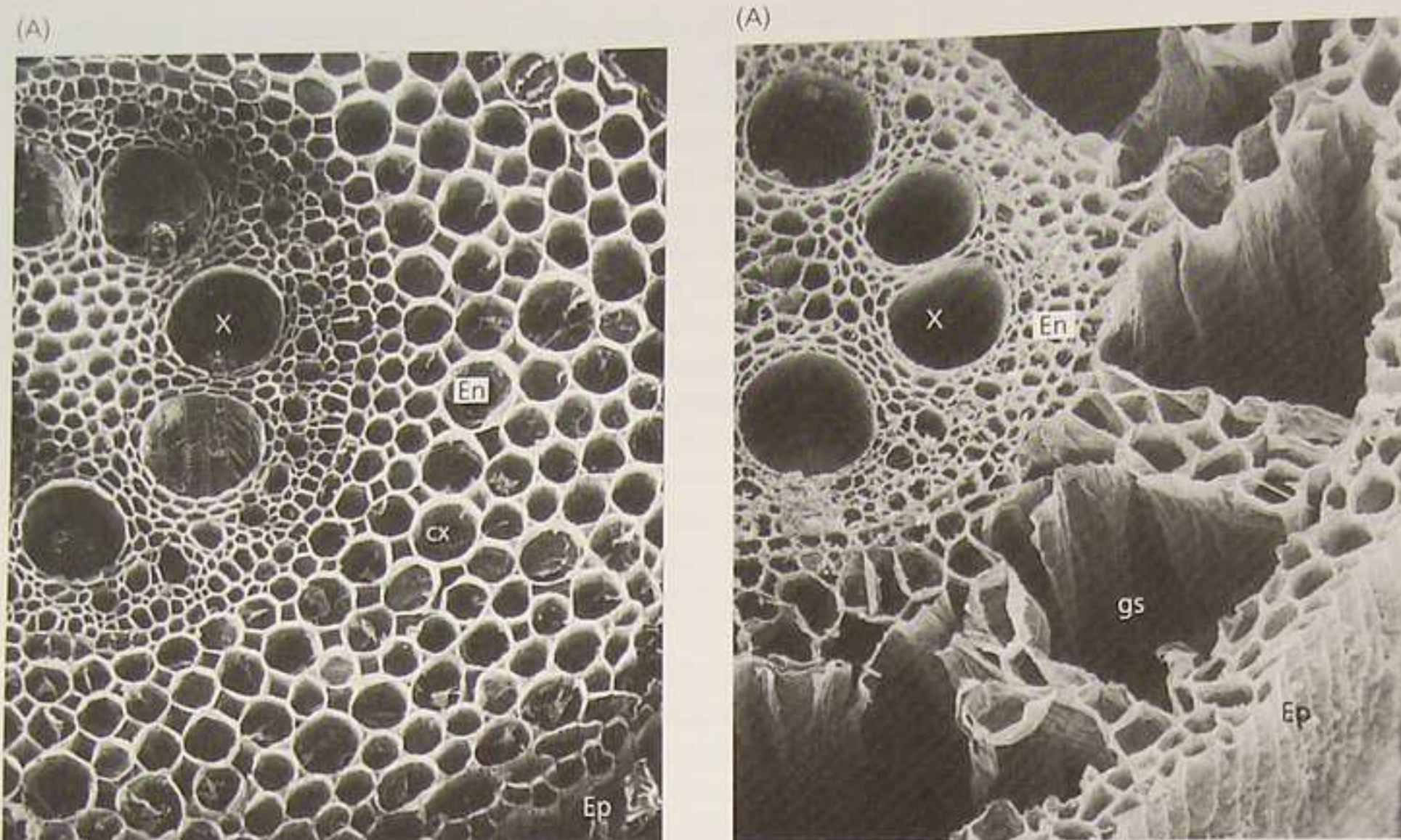



FIGURA 25.18 Electromicrografias (150x), de varredura, de seções transversais de raízes de milho, mostrando alterações estruturais com o suprimento de oxigênio. (A) Raiz-controle, suprida de ar, com células corticais intactas. (B) Raiz deficiente de oxigênio, crescendo em uma solução nutritiva sem aeração. Observe os espaços proeminentes (gs; do inglês, *gas-filled spaces*) no córtex (cx), formados pela degeneração de células. O estelo (todas as células internas à endoderme, En) e a epiderme (Ep) permanecem intactos. X, xilema (cedidas por J. L. Basq e M. C. Drew).

(um "respiradouro") para o resto da planta (mesmo sendo o arroz uma espécies de terras úmidas, suas raízes são tão intolerantes à anoxia como as do milho).

Com a extensão da raiz em direção ao solo deficiente de oxigênio, a contínua formação subapical de aerênquima permite o movimento do oxigênio no interior da raiz para suprir a zona apical. Em raízes de arroz e de outras plantas típicas de ambientes úmidos, as barreiras estruturais compostas de células suberizadas e lignificadas impedem a difusão do O_2 para fora, em direção ao solo. O O2 assim retido supre o meristema apical e permite o crescimento avançar 50 cm ou mais em direção ao solo anaeróbico.

Ao contrário, as raízes de espécies de ambientes não-úmidos, como o milho, permitem a saída do O_2, não o conservando na mesma quantidade. Assim, nos ápices das raízes destas plantas, o O_2 interno torna-se insuficiente para a respiração aeróbica e esta falta de O_2 limita severamente a profundidade que esses órgãos podem alcançar no solo anaeróbico.

A maioria dos tecidos vegetais não pode tolerar condições anaeróbicas

A maioria dos tecidos de plantas superiores não pode ter sobrevivência prolongada sob condições anaeróbicas. Os ápices de raízes do milho, por exemplo, permanecem viáveis por apenas 20 a 24 horas, se forem repentinamente privadas de O_2. Sob anoxia, uma certa quantidade de ATP é gerada lentamente por fermentação, mas o *status* energético das células declina de modo gradual durante a acidose citosólica. A combinação exata de características bioquímicas que permite a algumas células tolerar a anoxia por períodos longos não está totalmente compreendida. Os ápices de raízes do milho e de outros cereais exibem um modesto grau de aclimatação, se elas passarem primeiramente por hipoxia, podendo sobreviver acima de quatro dias de anoxia.

A aclimatação a uma condição anaeróbica está associada à expressão dos genes que codificam muitas das proteínas de estresse anaeróbico (ver a próxima seção). Após a aclimatação, é melhorada a capacidade de realizar fermentação etanólica sob anoxia (produzindo, assim, ATP para manter algum metabolismo em funcionamento), melhora que está acompanhada da capacidade de transportar lactato do citosol para o meio externo, minimizando, desse modo, a acidose citosólica (Drew, 1997).

A capacidade de órgãos de plantas de ambientes úmidos de tolerar anoxia crônica pode depender de estratégias semelhantes àquelas há pouco descritas, mas elas são claramente empregadas para efeito maior: os aspectos críticos parecem ser o controle do pH citosólico, a geração continuada de ATP por meio da glicólise e fermentação, e o armazenamento suficiente de reserva para a respiração anaeróbica durante períodos prolongados. Tem sido sugerido que a síntese de alanina, sucinato e ácido γ-aminobutírico, sob anoxia, consome prótons e minimiza a acidose citosólica. A evidência deste efeito tem sido observada em partes aéreas de arroz e capim-arroz tolerantes à anoxia, mas não em partes aéreas de trigo e cevada sensíveis à anoxia.

Os órgãos de espécies que se alternam entre metabolismo anaeróbico e aeróbico necessitam ocupar-se com as conseqüências da entrada de O_2 que segue a anoxia. Espécies altamente reativas ao oxigênio são geradas durante o metabolismo aeróbico; elas são normalmente destoxificadas por mecanismos de defesa celular que envolvem superóxido dismutase (SOD). Esta enzima converte radicais superóxido em peróxido de hidrogênio, que é então convertido em água pela peroxidase.

Em rizomas de *Iris pseudocorus* (lírio amarelo dos pântanos) tolerantes à anoxia, a atividade da SOD aumenta 13 vezes durante 28 dias de anoxia. Esse aumento não é observado em espécies de *Iris* não-tolerantes à anoxia. Em espécies tolerantes, a SOD pode estar disponível para agüentar o influxo de O_2, que ocorre quando as folhas emergem da água ou da lama, podendo, assim, ajudar na resistência ao estresse pós-anóxico.

A aclimatação ao déficit de O_2 envolve síntese de proteínas de estresse anaeróbico

Quando as raízes de milho são submetidas à anoxia, a síntese de proteínas cessa, exceto para a produção continuada de cerca de 20 polipeptídeos (Sachs e Ho, 1986). Tais proteínas de estresse anaeróbico, na sua maioria, têm sido identificadas como enzimas das rotas da glicólise e da fermentação.

O mecanismo da sensação de níveis de oxigênio reduzido sob condições hipóxicas ou anóxicas não está completamente claro. Não obstante, um dos primeiros eventos que segue o abaixamento dos níveis de O_2 é uma elevação do Ca^{2+} intracelular. Esta evidência sugere que o sinal do cálcio está envolvido na transdução do sinal de anoxia. Em minutos após o começo da anoxia, uma elevação da concentração do Ca^{2+} citosólico atua como um sinal, levando ao aumento em níveis de mRNA de álcool desidrogenase (ADH) e sacarose sintase em células do milho em cultura.

As substâncias químicas que bloqueiam um aumento de concentração de Ca^{2+} intracelular também impedem a expressão dos genes de ADH e sacarose sintase de ser induzida por anoxia, e aumentam bastante a sensibilidade de plântulas de milho à anoxia (Sachs e cols., 1996). Ainda é necessário esclarecer esses mecanismos e explicar como a concentração do Ca^{2+} intracelular sinaliza a sobrevivência inicial de células sob anoxia e a indução da morte celular e formação do aerênquima durante hipoxia prolongada.

A acumulação de mRNAs dos genes do estresse anaeróbico é conseqüência de mudanças na taxa de transcrição destes genes. A análise de elementos de seqüência comuns nos promotores dos genes ADH de milho e *Arabidopsis* e dos outros genes do estresse anaeróbico tem levado à identificação de um elemento de estresse anaeróbico e um elemento *G-box*. Tais elementos ligam fatores de transcrição de ação *cis*, levando à ativação transcricional destes genes. No entanto, ainda não estão determinados os detalhes exatos de como a deficiência de oxigênio é sentida e como é feita a transdução do sinal pelas elevações no Ca^{2+} citosólico, conduzindo a alterações na transcrição de genes específicos.

Deve-se observar também, que existe forte evidência que está também ocorrendo algum tipo de controle da tradução de genes do estresse anaeróbico. A eficiência com que mRNAs para genes não-anaeróbicos regulados por estresse são traduzidos, seguindo o estresse hipóxico, é drasticamente menor do que a de genes regulados por extresse, tal como ADH.

RESUMO

O estresse é em geral definido como um fator externo que exerce uma influência deletéria sobre a planta. Em condições naturais e agriculturais, as plantas estão expostas a ambientes desfavoráveis, o que resulta em algum grau de estresse. O déficit hídrico, o estresse provocado pelo calor e choque térmico, o resfriamento e o congelamento, a salinidade e a deficiência de oxigênio são os principais estressores que restringem o crescimento das plantas, de tal modo que as produtividades de biomassa ou agronômicas no final da estação expressam apenas uma fração do seu potencial genético.

A capacidade das plantas de suportarem ambientes desfavoráveis é conhecida como resistência ao estresse. As adaptações das plantas que conferem resistência ao estresse, tal como o metabolismo CAM, são geneticamente determinadas. A aclimatação melhora a resistência como um resultado de exposição anterior da planta ao estresse.

Os mecanismos de resistência à seca variam com o clima e as condições do solo. Os padrões de crescimento indeterminado, como os observados no sorgo e na soja, permitem que essas espécies sejam beneficiadas com chuvas de ocorrência tardia; nas plantas com um padrão de crescimento determinado, como o milho, por exemplo, falta a forma de resistência ao estresse hídrico. A inibição da expansão foliar é uma das primeiras respostas ao estresse hídrico, que ocorre quando decréscimos de turgor, resultantes do déficit hídrico, reduzem ou eliminam a força propulsora da expansão celular e foliar. Os mecanismos adicionais de resistência em resposta ao estresse hídrico incluem a abscisão foliar, expansão das raízes para zonas mais profundas e úmidas do solo e fechamento estomático.

O estresse provocado por déficit hídrico leva à expressão de conjuntos de genes envolvidos na aclimatação e adaptação ao estresse. Esses genes agem como intermediários das respostas celulares e de toda a planta descritas aqui. A sensação e ativação de cascatas de transdução de sinal mediando tais mudanças de expresão gênica envolvem rotas dependente e independente do ABA.

O estresse pelo calor e o choque térmico são causados por temperaturas altas. Algumas plantas CAM podem tolerar temperaturas de 60 a 65°C, mas a maioria das folhas é danificada acima de 45°C. A temperatura de folhas que transpiram ativamente em geral é mais baixa do que a temperatura do ar, mas o déficit hídrico restringe a transpiração e causa superaquecimento e estresse pelo calor. O estresse pelo calor inibe a fotossíntese e prejudica a função de membrana e a estabilidade protéica.

As adaptações que conferem resistência ao calor incluem respostas que reduzem a absorção de luz pelas folhas, tal como o enrolamento foliar, e uma diminuição do tamanho foliar que minimiza a resistência da camada limite e aumenta a perda de calor condutivo. As proteínas de choque térmico sintetizadas sob temperaturas altas atuam como chaperonas moleculares, que promovem a estabilização e o dobramento correto de proteínas; as respostas bioquímicas que levam à homeostase do pH e do metabolismo estão também associadas à aclimatação e à adaptação a elevações rápidas de temperatura.

O estresse por resfriamento e por congelamento decorre de temperaturas baixas. O dano por resfriamento acontece sob temperaturas demasiadamente baixas para o crescimento normal, mas que estão abaixo da congelamento; ele é típico de espécies de ori-

gens tropical e subtropical expostas a climas temperados. Os danos por resfriamento incluem crescimento lento, lesões foliares e murcha. A causa primária da maioria dos danos por resfriamento é a perda de propriedades de membranas decorrente de mudanças na sua fluidez. Os lipídeos de membranas de plantas resistentes ao resfriamento freqüentemente têm uma proporção maior de ácidos graxos não-saturados do que os de plantas sensíveis ao resfriamento.

As lesões por congelamento estão associadas primariamente ao dano causado por cristais de gelo formados dentro de células e órgãos. As espécies resistentes ao congelamento detêm mecanismos que restringem o crescimento de cristais de gelo para os espaços extracelulares. Os mecanismos que conferem a resistência ao congelamento, que é típica de plantas lenhosas, incluem a desidratação e o superesfriamento.

O estresse pelo frio reduz a atividade hídrica e leva ao estresse osmótico dentro das células. Esse efeito do estresse osmótico provoca a ativação de rotas de sinalização relacionadas a ele e a acumulação de proteínas envolvidas na aclimatação ao frio. Outros genes específicos do frio, não-relacionados ao estresse osmótico, são também ativados. As plantas transgênicas com superexpressão de componentes de sinalização ativados pelo estresse pelo frio demonstram aumento de tolerância ao frio.

O estresse pela salinidade resulta de acumulação de sal no solo. Algumas espécies halófitas são altamente tolerantes ao sal, mas a salinidade reduz o crescimento e a fotossíntese em espécies sensíveis. O dano pelo sal decorre de um decréscimo do potencial hídrico do solo, que torna a água do solo menos disponível, assim como da toxicidade de íons específicos acumulados em concentrações prejudiciais. As plantas evitam o dano provocado pelo sal por meio da exclusão do excesso de íons das folhas ou por compartimentação de íons em vacúolos. Alguns dos determinantes moleculares da exclusão de Na^+ e da compartimentação vacuolar têm sido determinados e tem sido estabelecida uma rota de sinalização, a rota SOS, que regula a expressão desses genes envolvidos na homeostase iônica.

A deficiência de oxigênio é típica de solos inudados. Ela reduz o crescimento e a sobrevivência de muitas espécies. Por outro lado, plantas de pântanos e de cultivos como o arroz estão bem-adaptadas a resistir deficiência de oxigênio no ambiente de suas raízes. A maioria dos tecidos de plantas superiores não pode sobreviver anaerobicamente, mas alguns órgãos, tais como o embrião e o coleóptilo do arroz, podem sobreviver por semanas sob condições anóxicas. As rotas metabólicas de resistência do dano anóxico e sua regulação têm sido descobertas.

Material da Internet

Tópicos da Internet

25.1 Condutância estomática e produtividades de cultivos irrigados
A condutância estomática prediz produtividades de cultivos irrigados crescendo em ambientes quentes.

25.2 Lipídeos de membrana e temperaturas baixas
As enzimas lipídicas de plantas mutantes e transgênicas imitam os efeitos da aclimatação à temperatura baixa.

25.3 Formação de gelo em células de plantas superiores
O calor é liberado quando o gelo se forma em espaços intercelulares.

25.4 Sinalização de Ca^{2+} e ativação da rota de sinalização do SOS (demasiadamente sensível ao sal)
Três *loci* ligados geneticamente controlam a homeostase iônica e a tolerância ao sal.

25.5 Transporte de Na^+ através da membrana plasmática e compartimentação vacuolar
SOS1 é um transportador de Na^+-H^+ do tipo antiporte que controla o fluxo de Na^+ pela da membrana plasmática.

25.6 Transferência gênica e tolerância ao estresse
As plantas transgênicas são instrumentos disponíveis para estudos sobre tolerância ao estresse.

Ensaio da Internet

25.1 O efeito da poluição do ar sobre as plantas
Os gases poluentes inibem a condutância estomática, a fotossíntese e o crescimento.

Referências bibliográficas

Apse, M. P, Aharon, G. S., Snedden, W. A., and Blumwald, E. (1999) Salt tolerance conferred by over expression of vacuolar Na+/H+ antiport in *Arabidopsis. Science* 285: 1256-1258.

Becwar, M. R., Rajashekar, C., Bristow, K. J. H., and Burke, M. J. (1981) Deep undercooling of tissue water and winter hardiness limitations in timberline flora. *Plant Physiol.* 68: 111-114.

Binzel, M. L., Hess, F. D., Bressan, R. A., and Hasegawa, P M. (1988) Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86: 607-614.

Bjorkman, O., Badger, M. R., and Armond, P A. (1980) Response and adaptation of photosynthesis to high temperatures. In *Adaptation of Plants to Water and High Temperatures Stress*, N. C. Turner and P J. Kramer, eds., Wiley, New York, pp. 233-249.

Blizzard, W. E., and Boyer, J. S. (1980) Comparative resistance of the soil and the plant to water transport. *Plant Physiol.* 66: 809-814.

Bohnert, H. J., Ostrem, J. A., and Schmitt, J. M. (1989) Changes in gene expression elicited by salt stress in Mesembryanthemum crystallinum. In *Environmental Stress in Plants*, J. H. Cherry, ed., Springer, Berlin, pp.159-171.

Boston, R. S., Viitanen, P V, and Vierling, E. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32:191-222.

Boyer, J. S. (1970) Leaf enlargement and metabolic rates in com, soybean, and sunflower at various leaf water potentials. *Plant Physiol.* 46: 233-235.

Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.

Bray, E. A., Bailey-Serres J., and Weretilnyk, E. (2000) Responses to abiotic stresses. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp.1158-1203.

Bressan, R. A., Nelson, D. E., Iraki, N. M., LaRosa, P C., Singh, N. K., Hasegawa, P M., and Carpita, N. C. (1990) Reduced cell expansion and changes in cell wall of plant cells adapted to NaCl. In *Environmental Injury to Plants*, E Katterman, ed., Academic Press, New York, pp. 137-171.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., and Jones, R. eds. (2000) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

Burke, M. J., and Stushnoff, C. (1979) Frost hardiness: A discussion of possible molecular causes of injury with particular reference to deep supercooling of water. In *Stress Physiology in Crop Plants*, H. Mussell and R. C. Staples, eds., Wiley, New York, pp.197-225.

Burssens, S., Himanen, K., van de Cotte, B., Beeckman, T, Van Montagu, M., hize, D., and Verbruggen, N. (2000) Expression of cell cycle regulatory

genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana. Planta* 211: 632-640.

Cramer, G. R., Lduchli, A., and Polito, V S. (1985) Displacement of Caz+ by Na+ from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79: 207-211.

Davies, W. J., Wilkinson, S., and Loveys, B. (2002) Stomata] control by chemical signaling and the exploitation of this mechanism to increase water-use efficiency in agriculture. *New Phytol.* 153: 449-460.

Drew, M. C. (1997) Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 223-250.

Drew, M. C., He, C. J., and Morgan P W. (2000) Programmed cell death and aerenchyma formation in roots. *Trends in Plant Science* 5:123-127.

Greenway, H., and Munns, R. (1980) Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 31: 149-190.

Gusta, L. V, Wilen, R. W., and Fu, P (1996) Low-temperature stress tolerance: The role of abscisic acid, sugars, and heat-stable proteins. *Hort. Sci.* 31: 39-I6.

Guy, C. L. (1999) Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 231-242.

Hartung, W., Wilkinson, S., and Davies, W J. (1998) Factors that regulate abscisic acid concentrations at the primary site of action at the guard cell. *J. Exp. Bot.* 49: 361-367.

Hasegawa, P M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 463-499.

Hong, S. W., and Vierling, E. (2000) Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:4392-4397.

Jenks, M. A., Eigenbrode, S., and Lemeiux, B. (In press) Cuticular waxes of *Arabidopsis.* In *The Arabidopsis Book,* C. Somerville and E. Meyerowitz, eds., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.

Kawasaki, S., Brochert, C., Deyholos, M., Wang, H., Brazille, S., Kawai, K., Galbraith, D. W., and Bohnert, H. J. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889-906.

Lee, J. H., and Schoeffl, F. (1996) An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic Arabidopsis thaliana. *Mol. Gen. Genet.* 252:11-19.

Levitt, J. (1980) *Responses of plants to environmental stresses,* Vol. 1, 2nd ed. Academic Press, New York.

Lindow, S. E., Amy, D. C., and Upper, C. D. (1982) Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. *Plant Physiol.* 70: 1084-1089.

Liu, J. P, and Zhu, J. K. (1997) An Arabidopsis mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14960-14964.

Lyons, J. M., Wheaton, T. A., and Pratt, H. K. (1964) Relationship between the physical nature of mitochondrial membranes and chilling sensitivity in plants. *Plant Physiol.* 39: 262-268.

Maggio, A., and Joly, R. J. (1995) Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems: Evidence for a channel-mediated water pathway. *Plant Physiol.* 109: 331-335.

Mantyla, E., Lang, V, and Palva, E. T. (1995) Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimation, and accumulation of LT178 and RAB18 proteins in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 107: 141-148.

Matthews, M. A., Van Volkenburgh, E., and Boyer, J. S. (1984) Acclimation of leaf growth to low water potentials in sunflower. *Plant Cell Environ.* 7:199-206.

McCree, K. J., and Richardson, S. G. (1987) Stomatal closure vs. osmotic adjustment: A comparison of stress responses. *Crop Sci.* 27:539-543.

Niu, X., Bressan, R. A., Hasegawa, P M., and Pardo, J. M. (1995) Ion homeostasis in NaCI stress environments. *Plant Physiol.* 109: 735-742.

Palta, J. P, Whitaker, B. D., and Weiss, L. S. (1993) Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of Solanum species. *Plant Physiol.* 103: 793-803.

Patterson, B. D., Paull, R., and Smillie, R. M. (1978) Chilling resistance in Lycopersicon hirsutum Humb. & Bonpl., a wild tomato with a wide altitudinal distribution. *Aust. J. Plant Physiol.* 5: 609-617.

Queitsch, C., Hong, S. W., Vierling, E., and Lindquist, S. (2000) Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis. Plant Cell* 12: 479-492.

Quintero, F. J., Blatt, M. R., and Pardo, J. M. (2000) Functional conservation between yeast and plant endosomal Na+/H+ antiporters. *FEBS Lett.* 471: 224-228.

Raison, J. K., Pike, C. S., and Berry, J. A. (1982) Growth temperatureinduced alterations in the thermotropic properties of Nerium oleander membrane lipids. *Plant Physiol.* 70:215-218.

Roberts, J. K. M., Hooks, M. A., Miaullis, A. P, Edwards, S., and Webster, C. (1992) Contribution of malate and amino acid metabolism to cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiol.* 98: 480-487.

Sachs, M. M., and Ho, D. T. H. (1986) Alteration of gene expression during environmental stress in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 37:363-376.

Sachs, M. M., Subbaiah, C. G., and Saab, 1. N. (1996) Anaerobic gene expression and flooding tolerance in maize. *J. Exp. Bot.* 47: 1-15.

Sauter, A., Davies W. J., and Hartung W. (2001) The long distance abscisic acid signal in the droughted plant: The fate of the hormone on its way from the root to the shoot. *J. Exp. Bot.* 52:1-7.

Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., and Zhu, J. K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS] encodes a putative Na+/H+ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 6896-6901.

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 3: 217-223.

Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H., and Shelp, B. J. (1995) Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.* 108: 543-549.

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J., and Thomashow, M. F. (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat-DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.

Sung, F. J. M., and Krieg, D. R. (1979) Relative sensitivity of photosynthetic assimilation and translocation of 14carbon to water stress. *Plant Physiol.* 64: 852-856.

Thomashow, M. (2001) So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.* 125: 89-93.

U. S. Department of Agriculture (1989) *Agricultural Statistics, U. S.* Government Printing Office, Washington DC.

Vierling, E. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.

Weiser, C. J. (1970) Cold resistance and injury in woody plants. *Science* 169: 1269-1278.

Williams, J. P, Khan, M. U., Mitchell, K., and Johnson, G. (1988) The effect of temperature on the level and biosynthesis of unsaturated fatty acids in diacylglycerols of *Brassica napus* leaves. *Plant Physiol.* 87: 904-910.

Wisniewski, M., and Arora, R. (1993) Adaptation and response of fruit trees to freezing temperatures. In *Cytology, Histology and Histochemistry of Fruit Tree Diseases,* A. Biggs, ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 299-320.

Wu, J., Lightner, J., Warwick, N., and Browse, J. (1997) Low-temperature damage and subsequent recovery of fabl mutant *Arabidopsis* exposed to 2 °C. *Plant Physiol.* 113: 347-356.

Zhang, J., and Zhang, X. (1994) Can early wilting of old leaves account for much of the ABA accumulation in flooded pea plants? *J. Exp. Bot.* 45: 133,5-1342.

Zhong, H., and Lauchli, A. (1994) Spacial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition rates in the growth zone of primary cotton roots: Effects of NaCI and CaCl2. *Planta* 194: 34-41.